



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Innovations pharmacologiques*

Présentée et soutenue par *Julien GONZALEZ*

Le 17 Septembre 2010

*Implication de la chimiokine CCL7
dans le développement de la fibrose tubulointerstitielle rénale*

JURY

Professeur Isabelle CASTAN - Présidente
Docteur Ulrich BLANK - Rapporteur
Docteur Nadine BOUBY - Rapporteur
Docteur Joost P. SCHANSTRA - Examineur

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologies, Toulouse*
Unité de recherche : *INSERM 858, équipe 5*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. Joost P SCHANSTRA et Dr. Jean-Loup BASCANDS*

Remerciements

Il m'est difficile de remercier individuellement toutes les personnes croisées au détour d'une rue, sur le banc d'un amphi ou derrière une paillasse qui m'ont permis d'arriver au terme de mon cursus universitaire.

J'adresse un grand MERCI à toutes ces personnes... Les boussoles qui aident à s'orienter lorsque tout semble obscur, les sceptiques à qui l'on veut donner tort, les boosters qui remplissent les batteries vides, les Mac qui ne te plantent jamais, les philosophes qui posent toujours des questions à première vue "stupides", les modèles que l'on veut égaler, les hyperactifs toujours prêts à bouger ou sortir, les confiants qui te donnent un costume trop grand pour tes épaules en disant "tu peux le faire", les chats parce que c'est bien les chats, les granola, élus meilleurs gâteaux du monde, les bisounours pour qui la vie n'est peuplée que de gens gentils, les étudiants qui m'ont fait confiance pour, à mon tour, essayer de leur transmettre ce que l'on m'avait appris... mais aussi les autres et encore ++++.

Parmi toutes ces personnes-là, les boussoles, les sceptiques, les boosters..., certains ont eu des rôles capitaux.

Il y a neuf ans, sur un coin de paillasse du labo de BCM, Cathy, tu m'as dit "Si tu n'as pas encore de stage, je te connais un labo sympa, je pense que vous vous entendriez bien...". Bien vu !!! Ce stage de BTS m'a permis de rebondir et de découvrir le monde de la recherche. Quatre ans plus tard, une autre de tes phrases : "ben pourquoi ça ne serait pas toi qui ferais le remplacement... ???". Juste MERCI.

Lors de ce premier stage, Jean-Loup et Joost ou Joost et Jean-Loup, les Dumb et Dumber du labo, les Thierry Roland et Jean-Michel Larqué¹ de la pipette, les Boule et Bill de la néphro ou encore les Simon et Garfunkel de la science, vous m'avez accueilli de la meilleure des façons. Merci d'avoir renouvelé et signé les conventions et les contrats tout au long de ces années... A votre contact, j'ai pu appréhender le métier de chercheur dans tous ses aspects et avec des points de vue différents. Je ne vais pas m'étendre mais je vous dois beaucoup, tant au niveau professionnel que personnel et je vous en remercie...

Enfin au cours de ces années, j'ai pu faire la connaissance de personnes qui me précédaient sur le chemin de la thèse. Par vos conseils, vos expériences ou vos connaissances, vous m'avez protégé, prévenu des difficultés que je pouvais rencontrer et ouvert la voie. Johan, Julie et Jean-Phi, MERCI pour ça. Nous en avons parlé plusieurs fois en refaisant le monde, mais j'espère que demain nous pourrons retravailler ensemble...

¹ Pour JLB : ce sont des commentateurs de foot.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Introduction bibliographique	4
Avant-propos	6
<u>Le rein</u>	<u>8</u>
1. Généralités	6
a. Anatomie	10
b. Fonctionnement	11
c. Rôles	12
2. Les pathologies rénales	14
a. Classification et causes	14
i. La néphropathie diabétique	14
ii. Les néphropathies auto-immunes	15
iii. Les néphropathies génétiques	16
iv. Les néphropathies obstructives	16
b. Diagnostic des pathologies rénales	17
c. Traitements	18
<u>La fibrose</u>	<u>20</u>
1. Définition	22
2. Les causes	23
3. Les étapes	24
a. Inflammation	25
i. Macrophages	27
ii. Cellules dendritiques	29
iii. Lymphocytes T	30
iv. Mastocytes et basophiles	33
v. Neutrophiles	34
b. Les médiateurs principaux de la fibrose	36
i. Transforming growth factor β : TGF β	36
ii. Connective tissue growth factor : CTGF	37
iii. Platelet-derived growth factor : PDGF	38
iv. Fibroblast growth factor : FGF	39
v. Bone morphogenetic protein 7 : BMP7	40
vi. Hepatocyte growth factor : HGF	41
c. Myofibroblastes	42
i. Une cellule...	42
ii. ... Plusieurs origines	45
- Fibroblastes	45
- Cellules épithéliales tubulaires	47
- Cellules endothéliales	49
- Fibrocytes	51
- Péricytes	51
- Conclusion	52
d. Accumulation de matrice extracellulaire	53
i. Les constituants de la matrice extracellulaire	54
- Les protéines	54
Collagène	54

Laminine	55
Fibronectine	55
- Les protéoglycanes	56
ii. Les acteurs et modulateurs	57
- Système Rénine/Angiotensine (SRA)	57
- Système Kinine/Kallikréine (SKK)	59
- Système du plasminogène	62
- Les MMP, TIMP et transglutaminases...	64
iii. Les conséquences	65
- Structurales	65
- Fonctionnelles	66
<u>Le système des chimiokines</u>	<u>68</u>
1. Historique de la chimiotaxie	70
a. De la communication à la chimiotaxie...	70
b. ... De la chimiotaxie aux chimiokines	71
2. Les chimiokines...	73
a. Structure	73
i. CXCL (Cys-X-Cys Ligand) ou α	74
ii. CCL (Cys-Cys ligand) ou β	74
iii. CL (Cys ligand) ou γ	75
iv. CX ₃ CL (Cys-X-X-X-Cys Ligand) ou δ	75
b. Classification	75
c. Rôles	76
i. Chimiotactisme	77
ii. Angiogénèse	78
iii. Tous les autres...	78
3. ... et leurs récepteurs	79
a. Structure et classification	79
b. Voies de signalisation	80
i. La phospholipase C	81
ii. La phosphoinositide 3-kinase	82
- Classe I :	83
Classe IA	83
Classe IB	84
c. Les récepteurs atypiques	86
i. D6 ou CCR10	87
- Description	87
- Mode d'action	88
- Rôle	89
ii. DARC (Duffy Antigen / Receptor for Chemokines)	91
- Duffy Antigen...	91
- ... Receptor for Chemokines	92
- Rôle	93
iii. CCX-CKR ou CCR11	95
iv. CXCR7	96
v. Conclusion	98
d. Les récepteurs viraux	98
4. Implication des chimiokines en pathologie	99
a. Chimiokines et VIH	99
b. Chimiokines et pathologies rénales	100
i. CCL2 et son récepteur CCR2	101

ii. CCL5 et ses récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5	102
5. CCL7, MCP-3, FIC, MARC... que le dernier ferme la porte !	103
a. Découverte de CCL7	104
b. Rôles connus de CCL7	105
i. Inflammation	105
ii. Recrutement de cellules souches	106
iii. Induction de la production de cytokines	106
iv. Effets fibrosants	107
v. Effets anti-VIH	107
vi. Effets anti-cancéreux	107
vii. Différenciation cellulaire	108
viii. Et chez l'Homme ???	108
c. Potentiel thérapeutique	109
i. Antagoniste	109
ii. Mutant	109
Résultats	112
Rôle de la chimiokine CCL7 dans le développement de la FTI rénale	114
1. Introduction	114
2. But de l'étude	114
3. Résultats	115
4. Discussion	115
5. Conclusion	118
6. Perspectives	118
Article 1	120
Autres résultats	154
Le récepteur B1 de la Bradykinine dans les pathologies fibrosantes rénales	156
1. Le récepteur B1 dans l'obstruction	156
2. Le récepteur B1 dans la glomérulonéphrite	157
Article 2	160
Article 3	170
Effet de l'inhibition de PAI-1 sur le développement de la FTI rénale	178
Article 4	180
Conclusion	188
Annexes	194
Article 5	196
Article 6	202
Bibliographie	210

Table des figures

Figure 1	Le système urinaire	page 10
Figure 2	Le néphron : unité fonctionnelle du rein	page 11
Figure 3	Evaluation de la fonction rénale par mesure du DFG	page 17
Figure 4	Les étapes de la fibrose tubulointerstitielle rénale	page 25
Figure 5	Le recrutement leucocytaire	page 26
Figure 6	La dualité des macrophages	page 28
Figure 7	Le lignage des lymphocytes T	page 31
Figure 8	Déplétion neutrophilaire dans le modèle d'OUU chez la souris	page 35
Figure 9	Le myofibroblaste et ses précurseurs	page 45
Figure 10	La transition épithélio-mésenchymateuse	page 48
Figure 11	Le système rénine / angiotensine	page 58
Figure 12	Le système des kinines	page 60
Figure 13	Le système du plasminogène	page 62
Figure 14	L'aérotaxie des bactéries	page 72
Figure 15	Les différentes familles de chimiokines	page 74
Figure 16	Nomenclature des chimiokines	page 76
Figure 17	Fonctionnement du gradient de chimiokines	page 78
Figure 18	Nomenclature des récepteurs aux chimiokines	page 80
Figure 19	La phospholipase C et l'activation des intégrines	page 82
Figure 20	La PI3K γ	page 85
Figure 21	Les récepteurs atypiques	page 86
Figure 22	Le récepteur D6	page 87
Figure 23	Les différents allèles du Duffy antigen	page 91
Figure 24	Le récepteur DARC	page 92
Figure 25	Le récepteur CCX-CKR	page 95
Figure 26	Le récepteur CXCR7	page 97
Figure 27	CCL7 et ses récepteurs	page 106
Figure 28	Les différents acteurs étudiés dans nos travaux	page 191

Résumé

Implication de la chimiokine CCL7 dans le développement de la fibrose tubulointerstitielle rénale

Les reins sont des organes impliqués dans l'homéostasie de l'organisme par leur fonction d'élimination. Les pathologies affectant le rein conduisent à une perte de sa fonction. De nos jours, il n'existe pas de moyen thérapeutique efficace pour en stopper la progression. Les traitements actuels ne permettent que de ralentir cette perte de fonction mais n'évitent pas l'apparition d'une insuffisance terminale qui n'a pour autres alternatives que la dialyse ou la transplantation.

La fibrose tubulointerstitielle caractérisée par l'accumulation de protéines matricielles dans l'espace situé entre les tubules rénaux, est corrélée à la perte de fonction rénale. Schématiquement elle se décompose en trois phases : inflammation, apparition de myofibroblastes et accumulation de matrice extracellulaire. La phase inflammatoire initiale est induite par l'expression de chimiokines. Ces petites cytokines aux propriétés chimiotactiques attirent les cellules immunitaires du sang vers le tissu rénal et sont donc à l'origine de l'inflammation. Il existe une cinquantaine de chimiokines réparties en quatre familles qui médient leurs effets par des récepteurs couplés aux protéines G. Parmi toutes ces protéines, nous nous sommes intéressés à la chimiokine CCL7. CCL7 ou MCP-3 peut activer les récepteurs CCR1, CCR2 et CCR3 et antagoniser le CCR5.

Nous avons caractérisé les effets de CCL7 dans la fibrose tubulointerstitielle induite par obstruction urétérale unilatérale. Pour cela, des animaux sauvages ou invalidés pour CCL7 ont été obstrués. Trois jours après obstruction, l'absence de CCL7 conduit à la diminution de l'inflammation, des myofibroblastes et de la fibrose alors qu'à huit jours, elle est sans effet sur l'inflammation et les myofibroblastes mais conserve son effet sur l'accumulation de matrice extracellulaire. Ces résultats sont confirmés par des études *in vitro* montrant que le traitement de cellules épithéliales tubulaires humaines mène à une surexpression de collagène. Enfin, à huit jours, les marqueurs des lymphocytes T régulateurs, immunosuppresseurs sont augmentés chez les animaux invalidés pour CCL7.

Cette étude montre que CCL7 pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la fibrose tubulointerstitielle rénale.

Abstract

Role of chemokine CCL7 in the development of tubulointerstitial fibrosis

Renal disease severely affects whole body haemostasis as the kidney plays an important role in the elimination of waste products. The currently used drugs only slow down kidney disease and in most cases do not avoid progression to end-stage renal disease.

The degree of tubulointerstitial fibrosis, characterized by extracellular matrix protein accumulation in the tubulointerstitium, is strongly correlated to the future loss of kidney function. Schematically, the development of tubulointerstitial fibrosis can be divided in three steps: inflammation, myofibroblasts accumulation and excessive extracellular matrix expression. Early phases of the inflammatory step involve the induction of chemokine expression. These small cytokines with chemoattractant properties induce recruitment of white blood cells from the blood to the tissue and are at the origin of inflammation. Currently, almost fifty different chemokines have been identified which mediate most of their effects by binding to G-protein coupled receptors.

In this study, we identify chemokine CCL7 as a new player in the development of tubulointerstitial fibrosis with differential effects in the early- and late-stages of unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced fibrosis. CCL7 (or MCP-3) can activate the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR3 and antagonize CCR5. At an early stage, three days after UUO, the absence of CCL7 reduced renal inflammatory cell infiltration, expression of profibrotic cytokines TGF β and CTGF and myofibroblast markers. In parallel the expression of the ECM protein fibronectin was significantly lower in mice lacking CCL7, while type I and III collagen expression was not modified. In contrast, at a later stage, 8 days after UUO, the absence of CCL7 was without effect on inflammation or myofibroblast accumulation but decreased the expression of CTGF and type I collagen, suggesting uncoupling between inflammation and the fibrotic response. *In vitro* studies confirmed these results suggesting that CCL7 can directly induce a fibrotic response *via* induction of CTGF and TGF β . In addition, at this late stage the absence of CCL7 induced the increase of markers of anti-inflammatory regulatory T cells.

These observations and the fact that CCL7 is an agonist of three different chemokine receptors makes CCL7 blockade an interesting alternative as compared to other chemokines in the search for new molecules to treat the development of renal fibrosis.

Introduction

bibliographique

"Quelle mécanique incompréhensible a soumis les organes au sentiment et à la pensée ?"
Voltaire, *Ingénu*, 20
(nous verrons qu'il est facile de penser cela en observant le fonctionnement du rein)

Avant-propos

Au cours de ces quatre années de thèse, j'ai été amené à travailler sur plusieurs sujets différents dont la trame commune a été d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la fibrose tubulointerstitielle (FTI).

Lors de la rédaction de ce manuscrit, au risque de le déséquilibrer ou de le rendre bancal, j'ai tenu à traiter un peu plus particulièrement ces sujets qui sortent du cadre des chimiokines.

Ainsi, l'étude de la déplétion neutrophilaire, le rôle de la $PI3K\gamma$, l'implication du récepteur B1 des kinines, les effets de l'acide lysophosphatidique et de son récepteur LPA1 dans la fibrose tubulointerstitielle sont présentés dans ce manuscrit. Je ne me suis pas senti le courage de les taire.

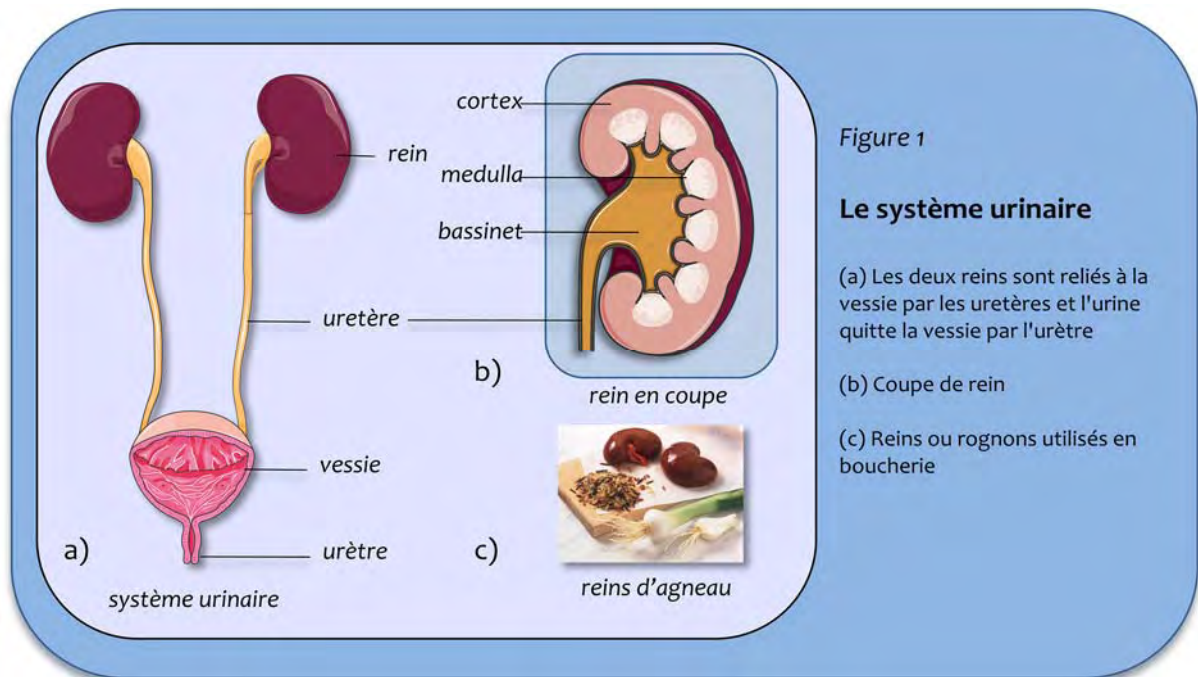
Il fallait choisir un axe pour cette thèse et CCL7 s'est imposée en tant que sujet principal. Elle et moi sommes arrivés ensemble en DEA et nous ne nous sommes plus quittés depuis, même si par certains moments, entre nous, les dissensions étaient grandes. Au terme de ces quatre années, notre complicité nous a conduits à la rédaction d'un article, à la finalisation du projet et à la présentation de cette thèse. Pour tout cela, je l'en remercie...

Le rein

"il était un foie, deux reins, trois fois rien..."
Bénabar, Bon anniversaire

1. Généralités

Les reins sont les organes qui, dans notre organisme, produisent l'urine. Nous verrons leur morphologie et leur constitution, leur fonctionnement et leurs rôles dans le maintien de l'homéostasie.

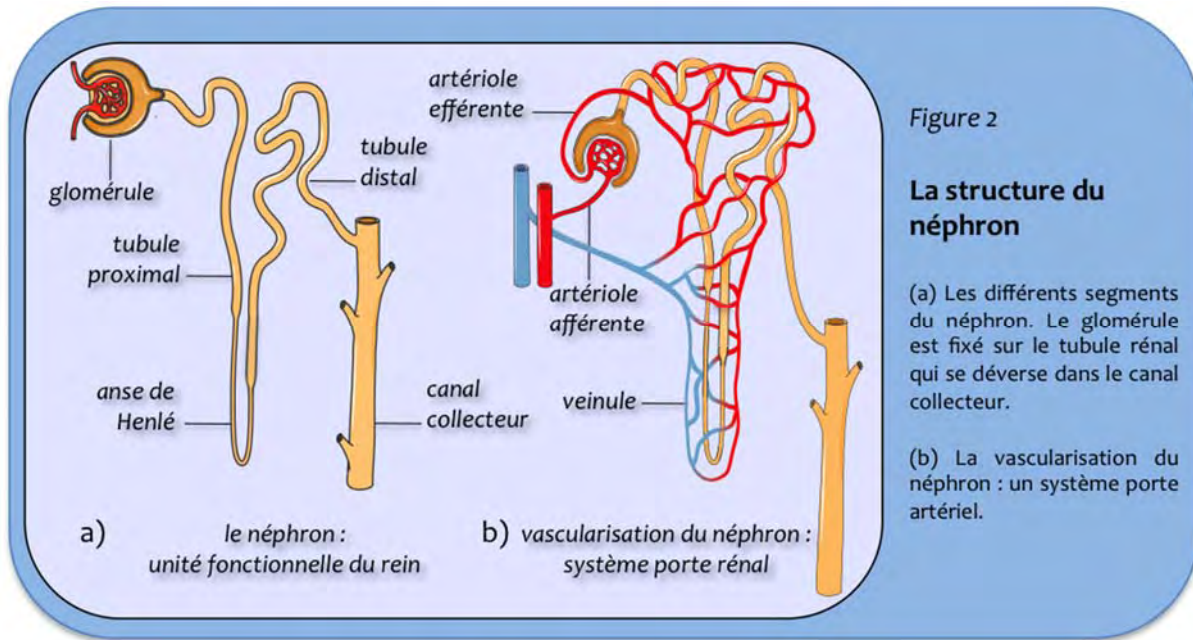


a. Anatomie

Les reins sont localisés sur la partie postérieure de la paroi abdominale. Ils ont une forme de haricot qui mesure, chez un homme moyen, 12 cm de haut, pour 6 cm de largeur. Je profite de ce chapitre pour fustiger une expression courante utilisée par une personne qui dit "j'ai mal aux reins" en se tenant le bas du dos. Dans l'abdomen, les reins sont sous le foie et donc beaucoup plus haut que les vertèbres lombaires douloureuses du bas du dos.

Chaque rein est composé d'environ un million d'unités fonctionnelles appelées néphrons (1-3). Un néphron est composé de deux parties, un glomérule dans lequel s'effectue la filtration du sang et la formation de l'urine primitive et un long tuyau appelé tubule dans lequel se produisent les échanges menant à l'élaboration de l'urine définitive. Ce tubule peut être découpé en plusieurs segments, le tubule proximal (segment contourné et segment droit), l'anse de Henlé (branches descendante, ascendante fine et ascendante large) et le tubule distal contourné. Ces tubules distaux se jettent dans des

canaux appelés canaux collecteurs qui se rejoignent et se déversent dans le bassinnet. A partir d'un million de néphrons, seuls quelques centaines de canaux collecteurs arrivent dans le bassinnet. Le bassinnet est relié à la vessie par l'uretère. La vessie est un organe creux de stockage fermé par des sphincters dont la décontraction permet la vidange vésicale. Cette vidange se fait de la vessie vers le milieu extérieur via l'urètre.



Le rein possède une vascularisation à la fois particulière et très développée. En effet, une artère afférente entre dans le glomérule pour former la pelote capillaire et en ressort sous la forme d'une artériole efférente et non pas de veinule. On a donc une artériole qui forme des capillaires se rejoignant pour former une autre artériole qui se subdivise en capillaires qui se jettent dans une veinule. Ceci constitue le seul système porte artériel de l'organisme, à l'inverse des systèmes porte veineux hépatique et hypothalamo-hypophysaire. De plus, le réseau capillaire provenant de l'artériole efférente entoure tout le tubule rénal, favorisant ainsi les échanges entre l'urine en cours de formation et le sang des vaisseaux.

b. Fonctionnement

La formation de l'urine permet d'éliminer une partie des déchets de l'organisme. Pour cela, le rein est amené à filtrer de grandes quantités de sang. Alors qu'il ne représente qu'1 % du poids corporel total, il reçoit 1/5^{ème} du débit cardiaque ce qui fait qu'il voit affluer 1600 L de sang par jour soit 1,6 m³. Sur ces 1600 L, seulement 180 L seront

filtrés et débarrassés de leurs déchets (3). Au final, en une journée, notre sang sera filtré 60 fois et 2 L d'urine seront éliminés.

Cette élimination répond à une équation très simple : "Excrétion = Filtration + Sécrétion – Réabsorption". La filtration se déroule au niveau du glomérule, la sécrétion et la réabsorption se font dans le tubule et l'excrétion représente ce qui sort de l'organisme (3).

Le glomérule est un filtre composé d'un premier tamis de cellules endothéliales capillaires qui retiennent tous les éléments figurés du sang ainsi que les protéines en fonction de leur masse et de leur charge. Le plasma passe ensuite au travers d'un réseau de matrice extracellulaire formant un gel de porosité régulée par la nature des molécules de cette matrice. Enfin, ce filtrat passe entre les podocytes pour se retrouver dans la capsule de Bowman. A ce stade là, l'urine primitive correspond à du plasma dépourvu des protéines ayant une masse molaire supérieure à 10 kDa. Cette filtration est due à la résultante des forces physiques que sont la pression oncotique et la pression hydrostatique (3).

L'urine primitive s'écoule le long du tubule. Là, plus de 99,5 % du sodium, 99 % de l'eau et la totalité du glucose sont réabsorbés. Les cellules qui constituent ce tubule sont à proximité des vaisseaux péritubulaires, facilitant les échanges. Ces cellules sécrètent des molécules qui n'ont pas pu être filtrées au niveau du glomérule et qui doivent être éliminées et réabsorbent les molécules filtrées mais nécessaires à l'organisme comme les acides aminés, le glucose et les sels. A sa sortie du canal collecteur, l'urine est définitive et identique à celle que l'on pourrait récupérer lors de la miction (3).

Tous les segments du tubule n'ont pas la même importance et le même rôle dans la formation de l'urine. Pour avoir un ordre de grandeur, le tubule proximal est le segment principal pour la réabsorption (environ 70 % de l'eau et du sodium) alors que le canal collecteur régule finement la composition de l'urine (3).

c. Rôles

Les reins ont cinq fonctions principales (2, 3).

Ils maintiennent l'équilibre hydrominéral de l'organisme. L'osmolarité (ou concentration totale de solutés) de tous les liquides de l'organisme est d'environ

300 mOsm/L. Chaque jour par l'alimentation, nous absorbons de nouveaux solutés. Or, toutes les fonctions cellulaires sont dépendantes de cette osmolarité. Afin que cette homéostasie soit maintenue, les apports par absorption intestinale doivent égaler les pertes et ce sont les reins qui se chargent principalement de l'excrétion de ces solutés en excès même si la peau, les poumons et le tube digestif peuvent intervenir. De plus, les volumes corporels ne sont pas extensibles et une trop grande quantité d'eau peut conduire à des oedèmes ou à une augmentation de la pression artérielle. Là encore, ce sont les reins qui régulent l'excrétion d'eau afin de maintenir constants les volumes liquidiens.

Un rôle parallèle et complémentaire au maintien de l'équilibre hydrominéral est la régulation du pH. Le catabolisme énergétique produit du dioxyde de carbone en aérobie et de l'acide lactique en anaérobie et ces produits ont des propriétés acides. Un organisme vivant produit donc en continu des radicaux acides qu'il faut éliminer afin que le pH ne diminue pas et que l'homéostasie acido-basique soit maintenue. Le rein par la régulation de l'élimination d'ions carbonates (HCO_3^-) composant le principal système tampon de l'organisme sera le garant du pH sanguin.

Sa fonction d'élimination de molécules potentiellement toxiques passe par l'excrétion des molécules exogènes telles que les médicaments, pesticides et autres polluants environnementaux ainsi que les produits du métabolisme azoté des acides aminés et des nucléotides.

Le rein n'est pas qu'un filtre ou une station d'épuration, il possède également des propriétés endocrines. Il produit l'hormone bien connue dans le milieu sportif qu'est l'érythropoïétine (EPO). Cette hormone stimule la production d'érythrocytes (globules rouges) et augmente ainsi les capacités de transport d'oxygène du sang. Via les cellules juxtaglomérulaires situées dans la paroi de l'artériole efférente à la sortie du glomérule, le rein synthétise la rénine dont nous reparlerons dans la suite de ce manuscrit. Enfin, il métabolise un précurseur de la vitamine D le rendant ainsi actif.

Un rôle souvent oublié est la production de glucose en situation de jeûne prolongé ou de diabète (4). En effet, par la voie métabolique de la néoglucogenèse, le rein peut produire à partir d'acides aminés, pyruvate ou glycérol, autant de glucose que le foie.

2. Les pathologies rénales

De par l'augmentation de l'espérance de vie et la modification des rythmes de vie, le nombre de patients atteints de pathologies rénales est en constante augmentation. Au Royaume-Uni, elles ont doublé au cours de la dernière décennie (5). Dans les pays développés, la progression annuelle est évaluée entre 5 et 8 % (6). En France, la prévalence des pathologies rénales est de 1057 par million d'habitants et l'incidence, de 146 nouveaux cas par million d'habitants en 2008 (7). Alors que la prévalence augmente d'environ 4 % par an, l'incidence reste stable. Les cas incidents sont dus pour un quart à la néphropathie diabétique et pour un autre quart à l'hypertension artérielle.

a. Classification et causes

La classification des néphropathies n'est pas encore uniformisée. Alors que certains auteurs les classent en fonction de leur durée de mise en place, en maladie rénale aiguë ou en maladie rénale chronique (8), certains les différencient en fonction de la localisation de l'atteinte, discriminant de la sorte, les glomérulopathies, les néphropathies tubulaires et les néphropathies vasculaires (1). Enfin, une dernière façon de faire est de les classer en fonction de l'étiologie de la pathologie. De cette manière, il existe des néphropathies génétiques, auto-immunes, infectieuses, du greffon, métaboliques...

Les maladies rénales ont une incidence et une présentation phénotypique très variables, avec un risque d'évolution vers l'insuffisance rénale chronique, la possibilité de développer une hypertension artérielle et, chez l'enfant, des répercussions possibles sur la croissance. Il n'y a pas de classification homogène. Toutefois, on distingue les néphropathies primaires qui sont spécifiques du rein et les néphropathies secondaires qui sont la conséquence de désordres extrarénaux.

i. La néphropathie diabétique

A l'heure actuelle, la maladie rénale la plus courante est une néphropathie secondaire et est la conséquence d'une pathologie métabolique, le diabète. Le nombre de patients atteints de diabète de type II a doublé sur les 25 dernières années aux Etats-

Unis et a été multiplié par un facteur compris entre trois et cinq en Inde, Chine ou Thaïlande (9). L'organisation mondiale de la santé prévoit qu'en 2030, 366 millions de personnes seront atteintes de diabète à travers le monde. Selon les études, 30 à 40 % des personnes diabétiques (soit plus de 100 millions en 2030) ont une néphropathie et ces patients-là représentent 20 à 40 % des personnes dialysées. Tous ces chiffres montrent que l'incidence des néphropathies diabétiques va encore s'accroître dans les années à venir et qu'une meilleure compréhension de ces pathologies est un enjeu de santé publique. Au niveau du tissu rénal, le diabète génère des lésions glomérulaires ne permettant plus une filtration adéquate du sang. Le tubule se doit de compenser les manquements du glomérule mais ce surcroît d'activité est un facteur de stress conduisant à des atteintes tubulaires. Ainsi, une atteinte initialement glomérulaire devient tubulointerstitielle au cours de la progression de la pathologie. La néphropathie se développe sur le long cours. En effet, plusieurs décennies sont parfois nécessaires pour qu'une personne diabétique présente des atteintes rénales.

ii. Les néphropathies auto-immunes

Les désordres immunologiques sont la seconde cause de néphropathies chez l'Homme. Ils donnent lieu à des manifestations histologiques très variées ayant pour seul dénominateur commun la présence d'immunoglobulines dans le glomérule. Ces pathologies se divisent entre formes primaires et formes secondaires (1). Dans les formes primaires (10), on retrouve la pathologie à anticorps anti-membrane basale glomérulaire (anti-GBM) appelée syndrome de Goodpasture (anticorps anti-collagène IV), les pathologies à dépôts d'immunoglobulines A (IgA) qui comprennent la maladie de Berger ou le Purpura rhumatoïde, les glomérulonéphrites extramembraneuses et les glomérulonéphrites membranoprolifératives. Pour les formes secondaires (1), le lupus érythémateux peut avoir des conséquences rénales ou les vascularites à ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) telles que la granulomatose de Wegener ou la maladie de Horton.

Dans tous les cas, l'accumulation d'immunoglobulines permet le recrutement des facteurs du complément dans le glomérule et provoque ainsi la lyse des cellules glomérulaires. Le filtre n'est plus fonctionnel et la fonction rénale est altérée.

iii. Les néphropathies génétiques

Les gènes impliqués dans la structure et la fonction rénales sont très nombreux et les mutations capables de les affecter le sont tout autant (11). Ainsi, des mutations du collagène IV présentes dans le syndrome d'Alport affectent la structure de la membrane basale glomérulaire. Dans les maladies kystiques, des mutations des protéines du cil primaire conduisent à la formation des kystes rénaux. La polykystose autosomique dominante est la pathologie dominante la plus fréquente affectant une personne sur mille. La fonction tubulaire peut également être touchée par des mutations des transporteurs impliqués dans les sécrétions et réabsorptions. Le syndrome de Bartter est lié à une mutation de transporteur sodium-potassium-chlore de la branche large ascendante de l'anse de Henlé... Ces quelques exemples sont là pour illustrer le fait que les mutations peuvent affecter des protéines structurales sécrétées, des récepteurs de signaux extérieurs et de protéines à activité enzymatique.

iv. Les néphropathies obstructives

Ces pathologies se retrouvent aux deux extrêmes de la vie. *In utero*, chez un enfant sur deux mille, on note un syndrome de la jonction pyelo-urétérale (12). Il se caractérise par une sténose de l'uretère. L'urine ne peut s'écouler normalement et s'accumule dans le rein créant ainsi un stress de nature mécanique sur tout le tissu rénal. Le traitement chirurgical rapide permet d'éviter les lésions irréversibles. A l'inverse chez la personne âgée, l'incidence de ces obstructions augmente (13). Les causes principales en sont l'hyperplasie prostatique, les tumeurs prostatiques, les lithiases ou encore la sténose urétérale.

Le modèle d'obstruction urétérale unilatérale (OUU) que nous utilisons au laboratoire en routine mime ces pathologies. Même si ce modèle consiste en une obstruction totale alors qu'elle est souvent partielle en pathologie humaine, il présente de nombreux avantages de rapidité, fiabilité et reproductibilité. Nous en reparlerons dans la partie expérimentale de cette thèse.

b. Diagnostic des pathologies rénales

L'évaluation des conséquences de ces pathologies nécessite au préalable des moyens d'étude de la fonction rénale. Le paramètre le plus utilisé est le débit de filtration glomérulaire (DFG ou GFR en anglais) (14). Il représente le volume de plasma filtré au niveau du glomérule par unité de temps et permet une évaluation de la fonction de filtration. Il est d'environ 120 mL/min chez un sujet sain.

Fonction rénale et sévérité de la pathologie			
Stade		Description	DFG (en mL/min/1,73m ²)
Sain		Fonction rénale normale	120
Pathologique	1	signes d'atteinte rénale	120 - 90
	2	Insuffisance rénale débutante	89 - 60
	3	Insuffisance rénale modérée	59 - 30
	4	Insuffisance rénale sévère	29 - 15
	5	Insuffisance rénale terminale	< 15

Figure 3

Evaluation de la fonction rénale par mesure du débit de filtration glomérulaire

Le DFG est calculé grâce à la clairance de la créatinine. La clairance rénale correspond à un volume de plasma totalement épuré par le rein d'une substance par unité de temps. On sait que la créatinine est une molécule qui est filtrée, non réabsorbée et non sécrétée (ou très faiblement). Pour ces raisons, sa clairance correspondra au DFG. Cette valeur est facile à obtenir par l'utilisation de formules de calcul et la connaissance de la concentration urinaire en créatinine et ne demande pas de geste médical invasif. Ceci en fait la technique de choix pour évaluer la fonction rénale. Toutefois, nous avons vu précédemment que le rein n'est pas qu'un filtre et qu'à la fonction glomérulaire s'ajoute la fonction tubulaire. Cette mesure nécessite des techniques exploratoires invasives par injection des différents marqueurs et recueil des urines (15).

L'urine est, en conditions normales, dépourvue de protéines. La présence de protéines sera considérée comme pathologique. Ainsi on évalue la concentration totale

en protéines qui doit être inférieure à 150 mg/jour. Ces protéines peuvent être le reflet de lésions du filtre glomérulaire ou du tubule. Si les protéines sont de haut poids moléculaire, on pensera à une atteinte de la fonction de filtration alors que si les protéines sont de faible poids moléculaire, on s'orientera vers des lésions des tubules qui ne remplissent plus leur rôle de réabsorption (16).

Enfin, l'outil diagnostique le plus juste, mais également le plus invasif, est la biopsie rénale. Il y a 50 ans, 90 % des pathologies rénales étaient inconnues des néphrologues. Ce n'est qu'avec la pratique de la biopsie que les connaissances histologiques et physiopathologiques des néphropathies se sont fortement accrues (1). Une aiguille permet en transcutané d'obtenir une carotte de tissu rénal et de l'analyser par des techniques de colorations ou d'immunomarquages histologiques. La principale complication de ce geste est l'hémorragie. Nous avons déjà évoqué le volume de sang qui afflue dans les reins et faire un trou dans un tissu aussi perfusé est risqué. Toutefois à l'heure actuelle, la biopsie est indispensable au diagnostic.

Dans le laboratoire, des études de protéomique urinaire proposent d'identifier des profils protéiques de référence associés aux différentes pathologies. Ainsi la comparaison du profil d'un patient à ces abaques permettrait le diagnostic sans avoir à biopsier le rein. Cette approche présente des avantages certains pour le patient qui éviterait une intervention et une hospitalisation et diminuerait également ses coûts de prise en charge. A n'en pas douter, la biopsie rénale deviendra dans l'avenir un geste exceptionnel.

c. Traitements

Lorsque l'insuffisance rénale terminale est installée, les seuls traitements possibles sont l'hémodialyse, la dialyse péritonéale ou, dans le meilleur des cas, la transplantation. L'hémodialyse trihebdomadaire consiste à filtrer le sang à l'extérieur de l'organisme et à le réinjecter dépourvu de ses déchets. Pour la dialyse péritonéale, une solution est injectée dans la cavité péritonéale puis récupérée, emportant avec elle les solutés à éliminer. La principale complication de cette thérapeutique est l'infection. La transplantation même si elle nécessite un acte chirurgical lourd est la meilleure alternative. Après l'opération, les patients retrouvent une fonction rénale normale. Le

problème majeur est la tolérance du greffon. Des traitements immunosuppresseurs chroniques augmentent la survie mais n'évitent pas le rejet sur le long terme.

Dans les stades 1, 2, 3 et 4 d'insuffisance rénale (8), le but principal est d'abaisser autant que le tolère le patient, la pression sanguine. A cette fin, toutes les molécules jouant sur ce paramètre peuvent être utilisées. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes du récepteur à l'angiotensine II bloquent les forts effets vasoconstricteurs de l'angiotensine (voir paragraphe dédié au système rénine angiotensine). Des diurétiques en diminuant la volémie réduisent la pression artérielle. Pour les pathologies immunitaires, des immunosuppresseurs réduisent les dépôts d'immunoglobulines et l'inflammation. Enfin, à la marge des traitements, le contrôle de l'alimentation est un facteur clé. La réduction des apports en sel et en protéine améliore la fonction rénale et surtout retarde l'aggravation des symptômes.

De nouvelles molécules sont actuellement à l'étude. Les inhibiteurs de la rénine ont présenté des effets protecteurs (17) sur les pathologies rénales chroniques. La pentoxifylline, la pentifylline et l'interferon γ (18) sont également testés.

La fibrose

"Nobody said it was easy"
Coldplay, The Scientist... ou Joost
(la propriété de cette phrase fait toujours débat !!!)

1. Définition

La fibrose peut affecter potentiellement tous les organes (19-21) et même l'organisme entier (22). Foie (23), poumon (24), cœur (25), rein (26), œil (27), peau (22), vaisseau sont des sites de choix pour l'établissement d'une fibrose. D'autres organes comme le tissu adipeux des obèses (28), le muscle squelettique des athlètes (29) ou même le pénis (30), peuvent être sujets à la fibrose.

Selon le "petit Larousse illustré", la fibrose est la "transformation fibreuse d'un tissu". Pour le site "Futura-Santé", c'est la "formation d'un tissu cicatriciel". Enfin, Wikipedia complète ces informations en donnant cette définition française :

"La fibrose (synonyme de sclérose) survient à la suite d'une destruction substantielle des tissus ou lorsqu'une inflammation a lieu à un endroit où les tissus ne se régénèrent pas. L'exsudat (protéines plasmatiques ayant migré vers le milieu interstitiel lors de la réaction inflammatoire) n'est pas réabsorbé ou ne l'est pas suffisamment (par la lymphe) et s'agence avec le tissu conjonctif dans le milieu interstitiel.

Face à des dommages tissulaires majeurs, la cicatrisation est la seule issue."

Ou anglaise :

"Fibrosis is the formation or development of excess fibrous connective tissue in an organ or tissue as a reparative or reactive process, as opposed to a formation of fibrous tissue as a normal constituent of an organ or tissue. Scarring is confluent fibrosis that obliterates the architecture of the underlying organ or tissue."

Toutes ces définitions, bien qu'incomplètes, mettent en évidence le caractère pathologique de la fibrose qui s'installe suite à une atteinte du tissu et une inflammation prolongée. Elle correspond à un remplacement des structures tissulaires lésées par un développement exagéré du tissu conjonctif sous-jacent.

"L'enfer est pavé de bonnes intentions" est une expression qui s'applique pleinement au processus fibrosant. Lors d'une réponse normale à une agression tissulaire (immunologique, mécanique ou encore chimique), l'organisme met en place des mécanismes de guérison et de reconstruction visant à rétablir la fonction de l'organe affecté. Les cellules détruites doivent être éliminées et remplacées par de nouvelles cellules fonctionnelles et la structure du tissu doit être maintenue par les protéines de la matrice extracellulaire du parenchyme. Pour cela, des cellules phagocytaires sont

recrutées, des facteurs de croissance sont sécrétés et des protéines matricielles sont synthétisées. Or, dans certaines conditions, il arrive que ces mécanismes perdurent et conduisent à l'apparition d'une fibrose, ainsi le tissu fibreux ou tissu cicatriciel conduit à des pertes de fonctionnalité de l'organe (19-21).

Au niveau cellulaire, le développement du parenchyme éloigne les cellules déjà agressées des vaisseaux sanguins et interfère avec les échanges de nutriments, créant ainsi un phénomène d'hypoxie et de carence nutritive qui amplifie le stress des cellules (31). Au niveau de l'organe, cette matrice extracellulaire rigidifie et empêche la déformation du tissu ce qui pour des organes compliants, comme le poumon (fibrose pulmonaire), mène à une perte de fonction. Un poumon atteint de fibrose ne pourra se remplir de façon correcte et nécessitera une force musculaire plus grande des muscles intercostaux (32).

Dans la suite du chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à la fibrose rénale. Dans cet organe, la fibrose peut se trouver au niveau du glomérule (glomérulosclérose), des vaisseaux (fibrose vasculaire) ou de l'espace interstitiel (fibrose tubulointerstitielle : FTI). Des études (33-37) ont montré que de toutes ces fibroses, la FTI était la plus fortement corrélée à la perte de fonction rénale. En effet, l'apparition d'une glomérulosclérose peut rester longtemps sans effet sur la fonction rénale si le compartiment tubulointerstitiel n'est pas touché (33) alors qu'à l'inverse certaines pathologies associées à une perte de fonction n'affectent pas le glomérule (34-36). Pour ces raisons, le laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à cette fibrose tubulointerstitielle et c'est celle que nous étudierons dans ce manuscrit.

2. Les causes

Les causes menant à la FTI sont nombreuses. Cependant, les cellules rénales semblent réagir toujours de la même façon en adaptant leur fonctionnement dans le but de maintenir la fonction et la structure du rein. Ce mécanisme de défense peut toutefois "s'emballer" et mener à la fibrose. Tous ces stress qu'ils soient glomérulaires, tubulaires ou vasculaires conduisent tôt ou tard à l'apparition de la FTI.

A titre d'exemple, la protéinurie découlant de lésions du glomérule est compensée par la réabsorption par le tubule. Toutefois, la réabsorption continue induit un stress du réticulum endoplasmique et perturbe la cellule tubulaire.

La raréfaction capillaire diminue les apports de nutriments et d'oxygène aux cellules. Le pH de l'environnement s'acidifie ce qui est délétère pour leur fonctionnement.

Dans les pathologies obstructives, la rétention de l'urine distend les cellules tubulaires ce qui est synonyme de stress mécanique.

Certains médicaments tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou la ciclosporine ont des effets secondaires néphrotoxiques.

Enfin, les infections bactériennes lors des pyélonéphrites mènent à la lyse de cellules. La libération du contenu cytoplasmique est très toxique pour les cellules qui se trouvent dans l'environnement direct.

3. Les étapes

Classiquement et surtout schématiquement, la mise en place de la FTI se fait en trois étapes successives.

- 1- En réponse à l'agression originelle, les cellules résidentes induisent le recrutement de cellules inflammatoires dans l'espace interstitiel qui créent ainsi un environnement inflammatoire. Ces cellules traitent, ou essaient de traiter, l'origine du stress initial et pour se faire, synthétisent de grandes quantités de cytokines et chimiokines.
- 2- Ces protéines sécrétées permettent le recrutement, la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ces cellules sont spécialisées dans la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et leur présence est corrélée à l'apparition de la fibrose.
- 3- Enfin, la fibrose elle-même se met en place par accumulation de MEC.

Il est important de noter que ces trois phases se mettent en place séquentiellement mais cohabitent lors d'une pathologie chronique se maintenant sur le long cours. Nous détaillerons chacune de ses étapes avec les principaux intervenants cellulaires et moléculaires.

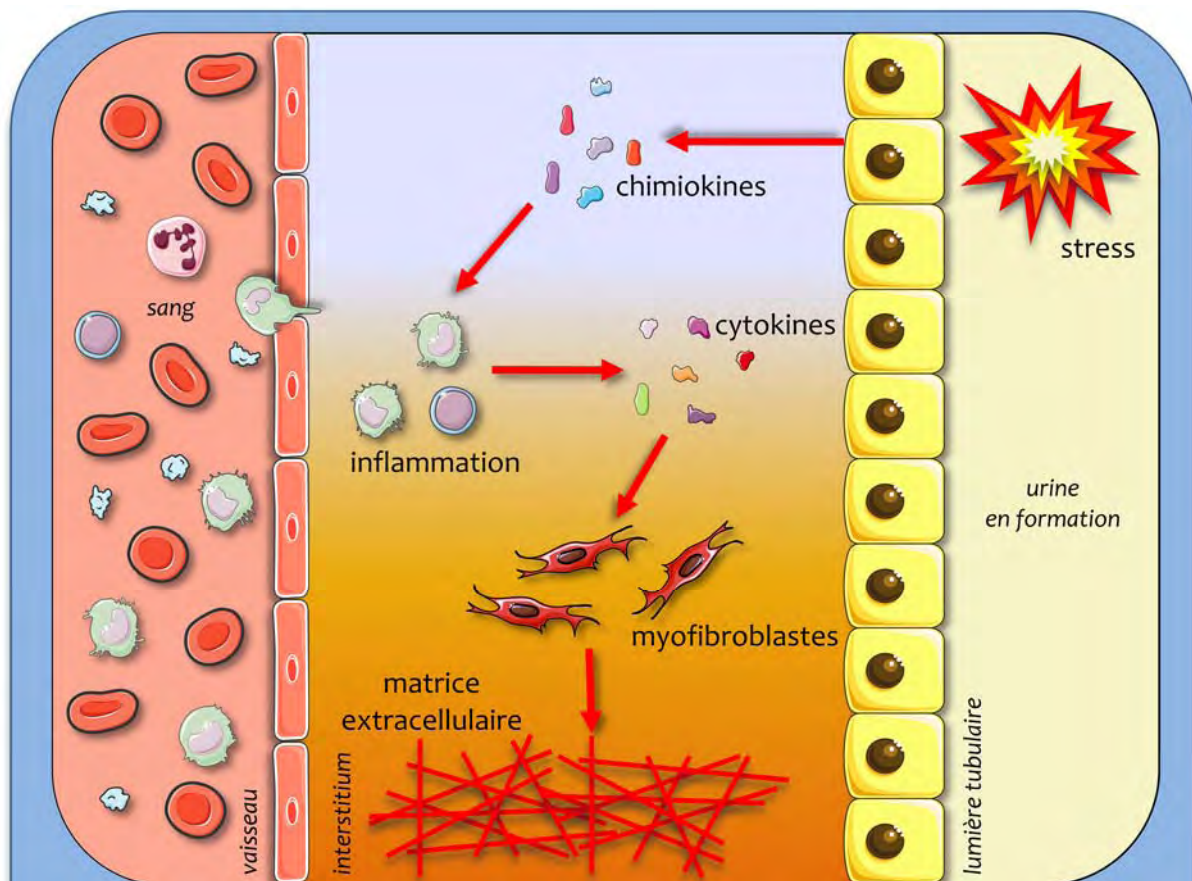


Figure 4

Les étapes de la fibrose tubulointerstitielle rénale

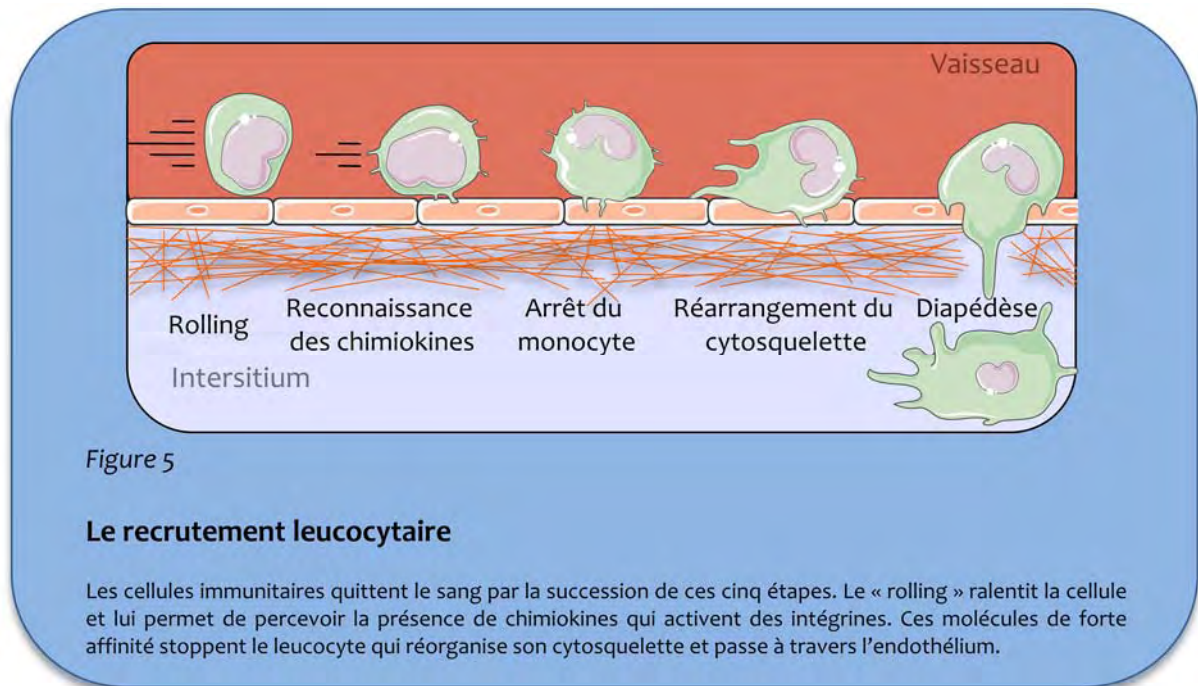
Un stress induit la synthèse par les cellules résidentes de chimiokines. Ces protéines participent au recrutement des cellules immunitaires dans l'interstitium. Les leucocytes produisent à leur tour des cytokines ayant des effets sur l'apparition d'un nouveau type cellulaire originellement absent, les myofibroblastes. Ces cellules sont responsables de l'accumulation de protéines matricielles.

a. Inflammation

Elle est la première à se mettre en place après l'agression initiale. Ce processus de défense se fait de façon séquentielle. Les cellules agressées produisent des chimiokines et autres médiateurs chimioattractants qui permettent le recrutement des cellules immunitaires puis différents leucocytes envahissent l'interstitium. Nous traiterons des chimiokines dans la seconde partie de cette introduction, nous ne parlerons donc ici que des différents leucocytes impliqués dans cette phase inflammatoire.

Lors d'une agression tissulaire, de grandes quantités de leucocytes quittent le sang afin de se rendre au plus près du lieu de l'agression. Pour cela, il se crée une étroite collaboration entre les cellules blanches et les cellules endothéliales. Ces dernières renseignent les leucocytes sur l'état sous-jacent du tissu et coopèrent pour le passage du

sang vers l'interstitium des cellules immunitaires. Ce mécanisme d'extravasation appelé diapédèse se décompose en cinq phases.



Le "rolling" est le terme employé pour désigner le mouvement des cellules à la surface de l'endothélium. Des protéines membranaires de faible affinité (sélectines) des leucocytes et des cellules endothéliales ralentissent la course des cellules.

Ce ralentissement augmente la probabilité que les cellules circulantes reconnaissent des chimiokines présentées à la surface de l'endothélium (voir chapitre 2). La fixation des chimiokines sur leur récepteur exprimé par les leucocytes induit l'expression à la membrane de protéines d'adhésion.

Ces protéines (ICAM, VCAM pour les cellules endothéliales et LFA-1, Mac-1, VLA-4 pour les leucocytes) stoppent le flux des monocytes qui sont fermement adhérents sur l'endothélium.

Les cellules immunitaires modifient la structure de leur cytosquelette, s'aplatissent et recherchent un lieu de passage propice.

La diapédèse à proprement parler, consiste au passage dans l'interstitium. Le passage peut se faire par voie para-cellulaire (entre deux cellules endothéliales) ou par voie trans-cellulaire (à travers une cellule endothéliale dont les membranes apicale et baso-latérale se rejoignent pour former un pore). Sous

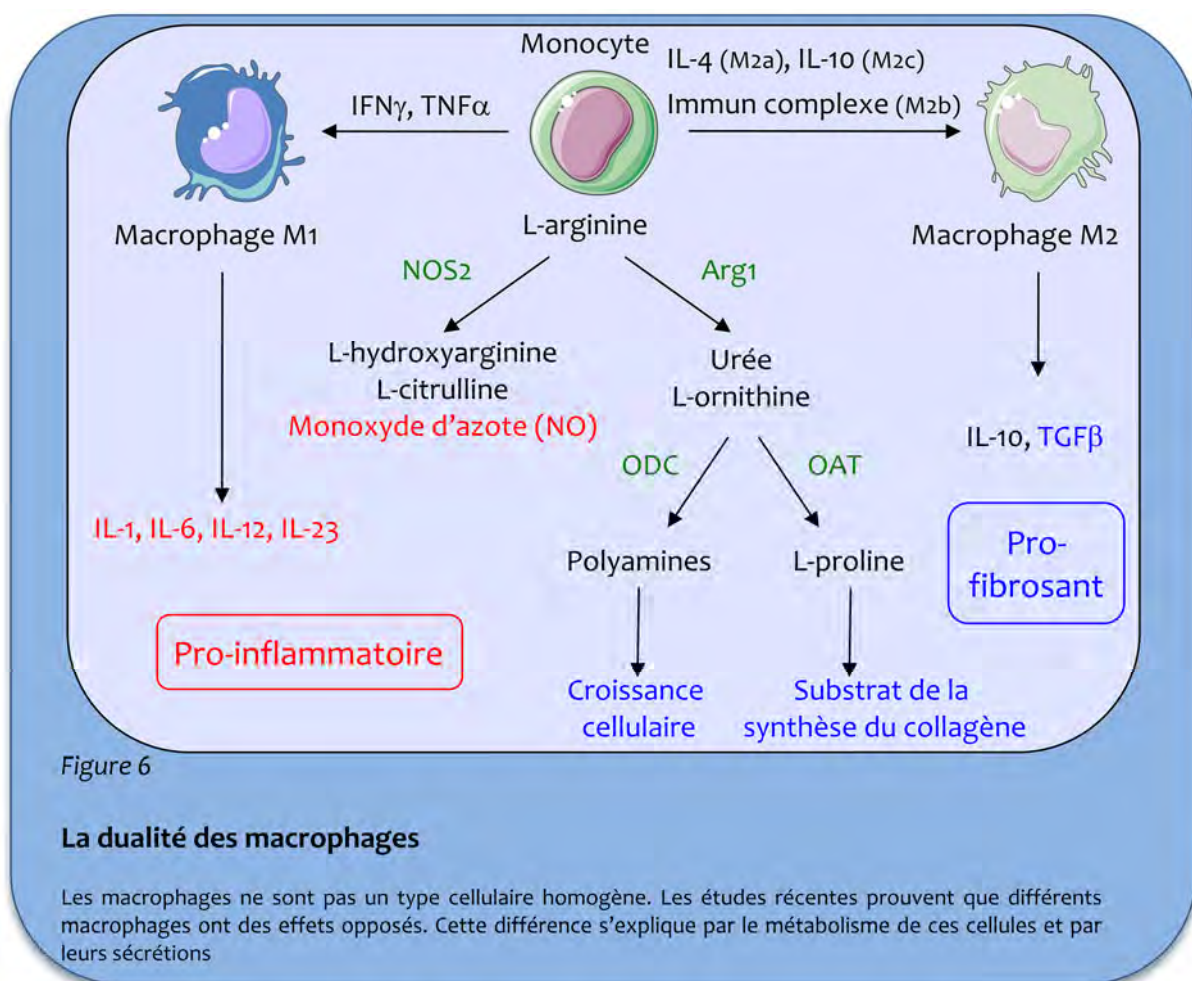
l'endothélium, le leucocyte doit encore traverser la membrane basale. Pour cela, il recherche une zone de faible résistance et grâce à son extrême plasticité passe à travers.

Les différents leucocytes impliqués dans ce processus inflammatoire sont nombreux et ont tous un rôle plus ou moins bien décrit dans la littérature. Nous passerons en revue ces cellules et leurs effets dans le développement de l'inflammation rénale.

ii. Macrophages

Les macrophages sont les leucocytes les plus nombreux dans la mise en place de la FTI. Ces cellules sont issues des monocytes sanguins qui s'activent en macrophages après stimulation. Les dernières années ont vu évoluer le concept de macrophages. Tous leurs effets décrits dans la littérature étaient trop larges et différents pour n'être dus qu'à un type cellulaire. En première intention et par analogie avec les lymphocytes T helper Th1 et Th2, ils ont été divisés en deux sous-groupes : les macrophages M1 ou "classiquement activés" et les macrophages M2 ou "alternativement activés" (19, 38-40). La façon classique d'activer un macrophage se fait par deux cytokines proinflammatoires, l'interféron gamma ($IFN\gamma$) et le tumor necrosis factor alpha ($TNF\alpha$). Les M1 ainsi activés relarguent de grandes quantités de cytokines proinflammatoires (interleukines 1, 6 et 23 : IL-1, IL-6 et IL-23), ont une production de radicaux libres oxygénés (RLO) fortement augmentée et par voie de conséquence, une forte activité antimicrobienne (39). Les macrophages M2 regroupent tous les macrophages non M1 et se subdivisent en M2a, M2b et M2c (40). Les M2a et M2b peuvent être regroupés dans le groupe des macrophages réparateurs (wound-healing macrophages) et les M2c dans le groupe des macrophages régulateurs (regulatory macrophages) (39, 40). Ces cellules régulatrices synthétisent les cytokines anti-inflammatoires bien connues que sont l'IL-10 et le $TGF\beta$. En plus de ces effets sur l'inflammation, cette dernière est également un puissant agent fibrosant qui confère aux M2 leur nom de réparateur. Au final, tous les M2 sont profibrosants mais seuls les M2c sont anti-inflammatoires. Ces cellules ont donc un rôle prépondérant dans la mise en place des processus fibrosants. Dans cette différenciation, le métabolisme de la L-arginine (L-arg) joue un rôle central (19, 41). Les macrophages M1 expriment l'enzyme NOS2 ou iNOS qui métabolise la L-arg en L-hydroxyarginine, L-

citrulline et oxyde nitrique (NO). Ce dernier par ses effets vasodilatateurs facilite la diapédèse des monocytes et favorise ainsi l'inflammation. A l'inverse les M2 possèdent l'Arginase-1 (Arg1) qui métabolise la L-arg en urée et en L-ornithine, elle-même dégradée par l'ornithine décarboxylase et l'ornithine amino transférase en, respectivement, polyamines et L-proline. Les polyamines sont impliquées dans la prolifération cellulaire alors que la L-proline est un précurseur indispensable à la synthèse des fibres de collagène. Nous venons de voir que les macrophages M2 sont profibrosants à plusieurs niveaux, par leurs sécrétions de cytokines et par leur synthèse d'éléments précurseurs des fibres de collagène.



Durant de nombreuses années, les macrophages ont été considérés comme "l'homme à abattre" dans l'inflammation rénale. Une étude compilant les résultats obtenus dans différents modèles de pathologies rénales et à différents temps indique une dualité dans le rôle des macrophages (42). Il semble que, lors de l'atteinte initiale et précocement dans le développement de la FTI, les macrophages soient délétères (42, 43)

alors que, lorsque l'inflammation devient chronique et la pathologie installée, ils soient bénéfiques (42, 44). Ceci pourrait s'expliquer par la nature des macrophages présents à différents moments de la pathologie (42). Précocément, afin de faire face à l'agression, des macrophages M2 profibrosants stabilisent le tissu par production de TGF β et par voie de conséquence de MEC. Lorsque l'inflammation perdure, le phénotype des macrophages pourrait s'orienter vers les M1 inflammatoires qui permettrait la résolution de cette accumulation exagérée de MEC.

Des expériences menées actuellement dans le laboratoire, visent à montrer les différents phénotypes de macrophages présents tout au long du développement de la FTI induite par obstruction urétérale unilatérale (OUU). Si les hypothèses sont confirmées, dans l'avenir, il serait intéressant de voir si pharmacologiquement, il serait possible d'orienter la différenciation des monocytes vers un phénotype plutôt inflammatoire que profibrosant.

iii. Cellules dendritiques

Il existe deux lignées de cellules dendritiques, la lignée plasmacytoïde et la lignée myéloïde (45-47). Les premières sont issues de précurseurs présents dans la moelle osseuse et quittent la moelle dans un stade déjà différencié alors que les secondes dérivent des monocytes sanguins (46). Ces cellules sont les cellules présentatrices d'antigène (CPA) les plus efficaces. Dans les tissus, elles patrouillent et métabolisent les antigènes de l'environnement. Activées par un pathogène ou un stress cellulaire, ce sont les premières à synthétiser la cytokine pro-inflammatoire qu'est le TNF α (48). Dans le foie, les cellules dendritiques contrôlent l'inflammation et, par voie de conséquence, la fibrose via la synthèse de TNF α (49). De par l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour permettre l'éducation des différentes cellules du système immunitaire acquis (47).

Ce n'est que depuis peu de temps que les cellules dendritiques ont été caractérisées dans l'interstitium rénal de souris saines ou atteintes de glomérulonéphrite (50). Sur des biopsies humaines, les cellules dendritiques auraient une localisation strictement tubulointerstitielle chez des patients atteints de glomérulonéphrite (51). Deux études de la même équipe montrent des résultats opposés sur l'implication des

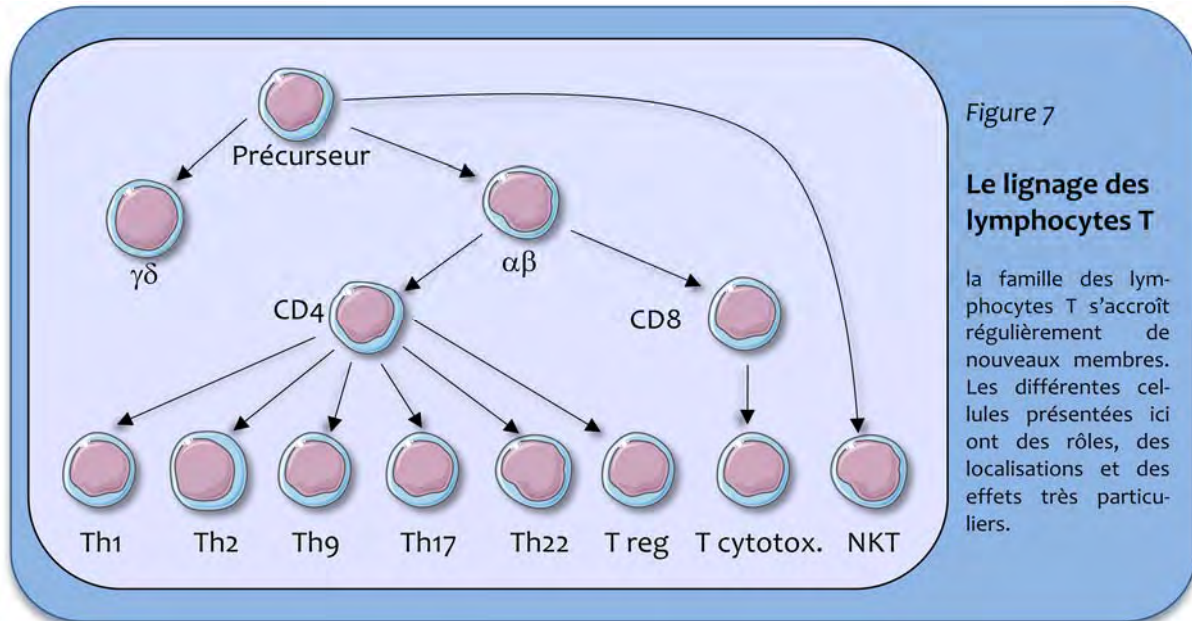
cellules dendritiques dans la glomérulonéphrite. Dans la première, les cellules dendritiques sont protectrices via la sécrétion d'IL-10 (52) alors que dans la seconde, ces mêmes cellules permettent la progression de la pathologie (53). Les auteurs proposent que ces effets divergents seraient dus à la différence d'origine des cellules dendritiques. Les cellules résidentes plasmacytoïdes seraient protectrices alors que les cellules recrutées myéloïdes seraient délétères pour le développement de la glomérulonéphrite. Enfin, dans un modèle de néphropathie obstructive et donc non immunologique, les cellules dendritiques ont également un rôle à jouer en augmentant la sécrétion de cytokines inflammatoires ainsi que le recrutement et l'activation des lymphocytes T et plus particulièrement des lymphocytes Th17 (54).

Le rôle des différentes cellules dendritiques n'est pour l'heure pas encore élucidé. Toutefois, au vu de ces quelques résultats, il semble que ce type cellulaire ait une implication majeure dans la mise en place de l'inflammation et ce, dans des modèles de fibroses immunologiques ou non.

iv. Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules ayant un rôle primordial dans l'orientation et la régulation de la réponse immunitaire (RI) (55). Ils possèdent un récepteur spécifique d'un antigène appelé le T cell receptor (TCR) et expriment le CD3. Ce TCR est composé de deux chaînes peptidiques $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Les premières représentent 95 % de la population totale de lymphocytes T. Pendant longtemps le rôle des lymphocyte T $\gamma\delta$ a été méconnu. Il a même été avancé que ces cellules, ne reconnaissant pas le non-soi, étaient un vestige de l'immunité primaire qui n'avait pas de rôle. Récemment, Polly Matzinger a émis une théorie sur l'immunité, le "danger model" (56, 57). Cette théorie se base sur le fait que les théories anciennes du soi et du non-soi ne permettaient pas d'expliquer des situations où un organisme était capable de tolérer du non-soi (par exemple, le fœtus pour la mère) et des situations où l'organisme réagit contre des structures du soi (par exemple, toutes les pathologies auto-immunes). Elle propose que l'élément principal pour l'élaboration d'une RI serait l'agression cellulaire ou tissulaire menant à l'émission de signaux de danger, que l'agression ait une étiologie exogène ou endogène. Ces signaux de danger ou de stress pourraient être des parties de protéines non vues en physiologie par le système

immunitaire comme par exemple toutes les séquences protéiques hydrophobes Hyppo (hydrophobic portion) qui sont soit ancrées dans les membranes, soit encapsulées à l'intérieur de la molécule. Lorsqu'elles sont visibles, c'est que les membranes des cellules ont été lysées ou que la protéine a été dégradée (56, 57). Les lymphocytes $\gamma\delta$ pourraient être les cellules spécialisées dans la perception des stress cellulaires et donc jouer un rôle primordial dans la régulation de l'inflammation dans des modèles de fibrose rénale stérile comme par exemple, l'OUU.



Pour les lymphocytes T $\alpha\beta$, leur nomenclature a considérablement évolué ces trois dernières années. Historiquement, ces cellules ont été différenciées par des marqueurs de surface : le CD4 et le CD8. Le CD8 est le marqueur des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) effecteurs (55). Ils reconnaissent des antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), protéine exprimée par toutes les cellules nucléées. Cette propriété de reconnaissance de l'antigène fait d'elles les cellules les plus efficaces dans la défense de l'organisme contre les cellules cancéreuses, les virus et autres pathogènes intra-cellulaires. Leur cytotoxicité se fait par trois voies principales (55). La première est la sécrétion de perforine, protéine formant des pores dans la membrane de la cellule infectée, et de granzymes, enzymes à activité sérine protéase. Ensemble ces protéines conduisent à la fuite du matériel cytoplasmique et la dégradation des protéines. La seconde fait intervenir le ligand du signal de mort Fas. Les LTC expriment le Fas-Ligand (Fas-L) qui en se liant à son récepteur Fas, exprimé par de

nombreuses cellules de l'organisme, active la voie apoptotique des caspases. Enfin, la dernière se fait par la sécrétion de cytokines induisant la mort comme par exemple le tumor necrosis factor alpha (TNF α).

Toujours dans la classe des lymphocytes T $\alpha\beta$, le CD4 marque les lymphocytes que l'on dit "helper" (Th) parce qu'ils fournissent les signaux d'activation (et donc aident) pour les lymphocytes effecteurs, LTC et lymphocytes B (55). Très longtemps, ces lymphocytes ont été divisés en Th1, régulant la réponse immunitaire (RI) à médiation cellulaire (macrophages, LTC) et Th2, régulant la RI à médiation humorale (anticorps). Toutefois, cette nomenclature ne permettait pas de distinguer des sous-classes particulières de lymphocytes Th (58). C'est ainsi que sont apparues les classes Th9 (59), Th17 (58, 60, 61), Th22 (62) et T régulateurs (T reg) (63). Leurs noms sont dus à l'interleukine qu'ils synthétisent (IL-9 pour les Th9, IL-17 pour les Th17 et IL-22 pour les Th22). Ces sous-types sont encore peu connus et leurs fonctions dans les pathologies rénales restent à mettre en évidence. Les T reg en revanche font l'objet de plusieurs études et sont un espoir thérapeutique important. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de CD4+, CD25+ et Foxp3+ et synthétisent de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10 est le fer de lance. Ces lymphocytes permettent la mise en place de la tolérance envers certains antigènes et la résolution de l'inflammation lorsque celle-ci n'a plus de raison d'être. Dans la fibrose pulmonaire idiopathique, le nombre de T reg est inversement proportionnel à la sévérité de la pathologie (64) et dans un modèle de néphropathie induite par l'adriamycine, le recrutement de T reg réduit les lésions tissulaires (65).

Enfin, à la marge de ces lymphocytes T, existent des lymphocytes NKT qui partagent des propriétés des cellules natural killer (NK) et des lymphocytes T. Ce sont des cellules effectrices qui ne reconnaissent pas l'antigène lorsqu'il est présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) mais lorsqu'il est apprêté par un ancêtre du CMH, le CD1 (66).

Dans le rein, les lymphocytes T ont été décrits dans les phénomènes inflammatoires depuis de nombreuses années. Dans certaines glomérulonéphrites, une étude de la fin des années 80 a montré que dans l'interstitium, les lymphocytes T étaient plus nombreux que les macrophages (67). Dans le modèle obstructif, les lymphocytes T ne joueraient pas de rôle primordial dans le développement de la FTI (68). Toutefois, au

vu des nouvelles découvertes dans ce domaine, leur étude dans les néphropathies semble être de premier intérêt. Comprendre l'implication des lymphocytes T et leur cinétique de recrutement dans le rein est une condition *sine qua non* à l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires dans la fibrose rénale.

v. Mastocytes et basophiles

Les mastocytes et les basophiles sanguins sont des cellules possédant de nombreux points communs. Longtemps, on a pensé que les basophiles étaient les précurseurs des mastocytes (69) mais l'on sait maintenant que ces cellules issues du même progéniteur granulocyte/monocyte, sont différentes. En effet, les basophiles quittent la moelle osseuse dans un état différencié et passent dans les tissus au niveau du site inflammatoire alors que les cellules mastocytaires quittent la moelle osseuse à un stade précurseur et ne terminent leur différenciation qu'à leur entrée dans le tissu sain (69, 70). Les demi-vies de ces cellules diffèrent également, les basophiles ont une demi-vie de quelques jours alors que les mastocytes en ont une beaucoup plus longue (69).

Ces deux types cellulaires ont la particularité de posséder de nombreuses vésicules cytoplasmiques contenant, entre autres choses, de l'histamine, des prostaglandines, des protéases (chymase et tryptase) ou encore de l'héparine (69-71). A leur surface, ils expriment le récepteur aux IgE de forte affinité, FcεRI, qui est impliqué dans les phénomènes allergiques (55, 69, 70). La fixation croisée d'un antigène sur deux Immunoglobulines de type E, elles-mêmes fixées à leurs récepteurs, FcεR conduit à la dégranulation de ces cellules et à la libération dans le milieu extérieur de tout le contenu vésical (55). Le principal constituant de ces granules qu'est l'histamine est un puissant vaso-dilatateur qui facilite la migration des autres composants du système immunitaire du sang vers le tissu (55, 69, 70).

Dans les pathologies rénales, beaucoup d'études observent la présence des mastocytes dans l'interstitium rénal (69, 71-75). Toutefois, leur rôle est encore mal connu dans le développement des néphropathies. Dans le modèle de néphrectomie subtotale, il y a une association entre la présence de mastocytes et le stade de la pathologie (72). Grâce à l'utilisation d'animaux ne possédant pas de mastocytes, une autre étude met en

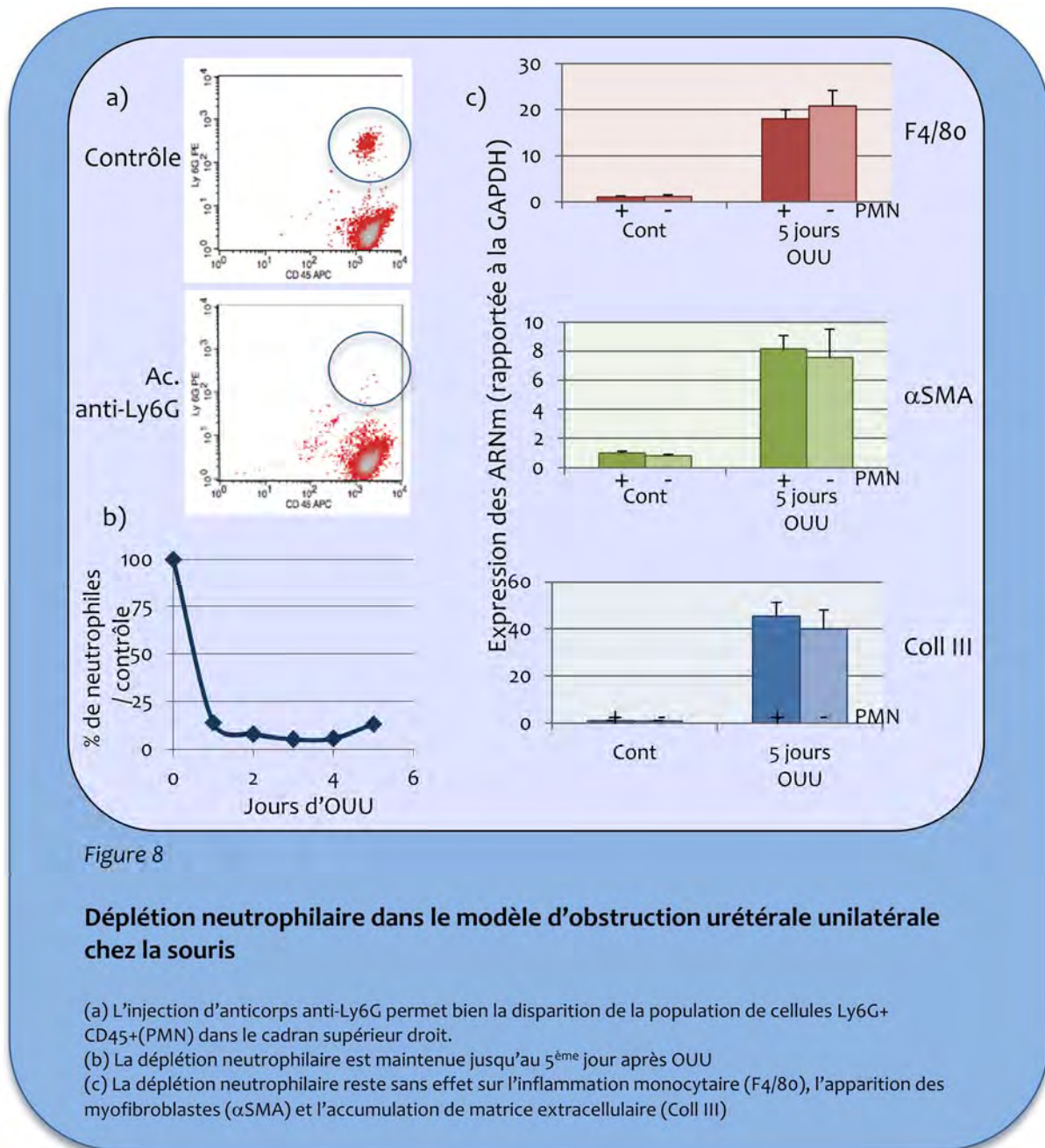
évidence dans la glomérulonéphrite induite par injection de sérum anti-GBM que les mastocytes contribuent à la progression des lésions tissulaires (75). De façon intermédiaire, les cellules mastocytaires réduisent faiblement l'accumulation de collagène interstitiel dans un modèle de néphropathie induite par la puromycine (74). Enfin dans le modèle d'OUU, les mastocytes réduisent l'infiltration de macrophages et de lymphocytes T, l'accumulation de myofibroblastes ainsi que la fibrose (73). Toutes ces études montrent que les mastocytes ont un rôle complexe et ambigu dans le développement de la fibrose rénale et nécessitent de plus amples investigations afin de comprendre leur implication réelle.

vi. Neutrophiles

Les neutrophiles ou cellules polymorphonucléaires (PMN) sont les cellules immunitaires circulantes les plus nombreuses représentant 50 à 70 % de tous les leucocytes (55). Ces cellules ont un turn-over très important puisque, par jour, un adulte produit 10^{10} neutrophiles ayant une durée de vie allant de quelques heures à quelques jours (55). Ils représentent la "chair à canon" de la RI et sont la première ligne de défense de l'organisme contre de nombreuses agressions. Très rapidement recrutés, ils phagocytent les bactéries ou encore les cellules lésées ou mortes. Leur activité phagocytaire est dépendante de granules cytoplasmiques ayant la propriété de fixer les colorants basiques et acides. Ces granules lysosomiaux peuvent être primaires ou secondaires en fonction de leur taille et de leur densité, et contiennent des peroxydases pour la production de radicaux libres oxygénés, du lysozyme qui dégrade la paroi bactérienne et diverses autres protéases (55). Les granules fusionnent avec les phagosomes et dégradent les contaminants. Les produits de la lyse sont relargués dans le milieu extérieur car les neutrophiles n'ont pas de rôle de CPA. Comme pour les macrophages, une étude montre que les neutrophiles des tumeurs se divisent en deux groupes, les neutrophiles N1 anti-tumoraux qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et les neutrophiles N2 pro-tumoraux activés par le TGF β (76).

Plusieurs études se sont intéressées au rôle que pouvaient jouer les neutrophiles dans les pathologies rénales. Or il semblerait que dans l'insuffisance rénale aigüe induite

par ischémie/reperfusion (77), les neutrophiles aient un rôle modeste dans l'établissement des lésions.



Dans le modèle d'OUU, plusieurs études dans des espèces différentes montrent que le moment d'arrivée des neutrophiles dans le rein varie. Chez la souris (78), dès 3 jours post-OUU, on observe une augmentation du taux de neutrophiles alors qu'il faut attendre 14 jours chez le rat (79). Au cours de ma thèse, il nous a paru intéressant de regarder l'effet d'une déplétion neutrophilaire sur le développement de la FTI chez la souris. Pour cela, nous avons procédé à une déplétion par anticorps anti-Ly6G le jour précédant l'OUU. Les vérifications par cytométrie en flux et par numération sanguine ont

montré une bonne inhibition du taux de neutrophiles sanguins jusqu'à J5. Les animaux ont été euthanasiés à J5. Toutes les analyses n'ont montré aucune modification de la pathologie entre les animaux possédant ou non des neutrophiles. Ces résultats montrent que les neutrophiles dans le modèle d'OUU ne semblent pas avoir d'effet sur la FTI. Toutefois, il pourrait être intéressant de regarder le rôle de ces cellules, plus tard dans le développement de la pathologie.

b. Les médiateurs principaux de la fibrose

L'accumulation de myofibroblastes dans le tissu rénal est due à la stimulation des différents précurseurs par des médiateurs. Ces médiateurs peuvent être des cytokines activatrices (TGF β , CTGF...) ou inhibitrices (HGF, BMP7). De plus, la littérature récente met en avant des cytokines déjà connues depuis plusieurs années dans d'autres mécanismes physiopathologiques. La relaxine en est le parfait exemple. Cette cytokine de la famille de l'insuline connue depuis 1993 pour ses effets utérins, semble être un puissant agent contrebalançant les effets du TGF β sur la FTI (80).

Par souci de simplification, seules les cytokines et facteurs de croissance les plus étudiés seront présentés dans ce paragraphe.

i. Transforming growth factor β : TGF β

Le TGF β regroupe trois isoformes appelées TGF β -1, -2 et -3 même si la plus abondante est l'isoforme 1 (81). Il est synthétisé en grande partie par les cellules du système immunitaire pour lesquelles il est une cytokine anti-inflammatoire primordiale. Cette cytokine est stockée sous sa forme latente, liée à la matrice extracellulaire (81-83). Une étude a montré l'implication de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP-2) dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et cet effet passerait par la libération du TGF β latent adsorbé sur les molécules de la MEC (81, 84). Une étude récente met en avant un rôle similaire pour MMP9 dans l'induction de l'EMT *in vitro* (85). Pour médier son signal, le TGF β se lie à son récepteur T β RII qui recrute par la suite un autre récepteur, le T β RI. Cet hétérodimère de récepteurs active ensuite les voies de transduction des Smad

et des MAPK (81). Le récepteur phosphorylé Smad 2/3 qui en conséquence dimérise avec Smad 4 et est exporté au noyau.

Le rôle du TGF β sur l'apparition de la fibrose se fait à plusieurs niveaux. Tout d'abord, il est le principal inducteur de l'EMT dont il est le seul capable d'induire toutes les étapes (86, 87). De plus, il peut agir sur les cellules épithéliales tubulaires, les fibroblastes et les myofibroblastes et induire la sécrétion de protéines de matrice extracellulaire.

Dans les modèles de pathologies rénales obstructives, le blocage du TGF β par des anticorps neutralisants conduit à une diminution de l'apoptose des cellules tubulaires (88). Ceci est confirmé *in vitro* où le TGF β induit l'apoptose de cellules tubulaires (89). Lorsque des ADN anti-sens anti-TGF β sont administrés par voie urétérale rétrograde, la fibrose induite par OUU est diminuée (90).

Ces résultats ne sont que quelques exemples d'une littérature très riche, illustrant le rôle primordial du TGF β dans le développement de la fibrose. Le TGF β semble donc être une cible thérapeutique de premier ordre pour le traitement des pathologies fibrosantes. Toutefois, de par ses propriétés ambivalentes profibrosantes et anti-inflammatoires, l'absence d'expression du TGF β 1 conduit à une inflammation généralisée des souris et à la mort avant la quatrième semaine de vie (91). Les effets anti-inflammatoires du TGF β seraient donc indispensables à l'homéostasie de l'organisme. A la suite de ces résultats, la recherche s'est intéressée aux cytokines profibrosantes synthétisées en réponse à la stimulation par le TGF β .

ii. Connective tissue growth factor : CTGF

Une autre cytokine jouant un rôle important dans la fibrose est le CTGF (connective tissue growth factor). Cette cytokine est impliquée au cours du développement dans l'ossification et la chondrogenèse. Pour cette raison, des souris invalidées pour cette protéine décèdent très rapidement après la naissance (92). Chez l'adulte, elle est de première importance dans les processus de cicatrisation et de réparation tissulaire (93).

Dans les pathologies fibrosantes rénales, le CTGF est étudié en parallèle du TGF β . En effet, de nombreuses études montrent que le TGF β , mais également, l'angiotensine II, l'endothéline, le glucose ou encore des stress mécaniques ou oxydatifs sont capables

d'induire la synthèse du CTGF (93, 94). A la différence du TGF β qui est synthétisé par les cellules immunitaires, le CTGF semble être produit uniquement par les cellules résidentes du rein (18, 93). Sur des cultures de fibroblastes rénaux, la transfection d'ARN anti-sens du CTGF bloquent la production de fibronectine induite par le TGF β (95). Cette étude laisse à penser que les effets profibrosants du TGF β seraient dus en totalité à l'expression du CTGF. Sécrété dans l'interstitium, il induit la prolifération des fibroblastes et la synthèse de protéines de la MEC telles que les collagènes de types I, III et IV par ces mêmes fibroblastes (93).

Chez l'animal, l'injection sous-cutanée de TGF β seule induit une fibrose dermique alors que l'administration conjointe de TGF β et de CTGF mène à l'installation d'une fibrose persistante (96). Au laboratoire, des travaux ont mis en évidence l'effet profibrosant de l'acide lysophosphatique, LPA, et de son récepteur LPA $_1$ dans le modèle d'OUU (97, 98). Le blocage de ce récepteur par un antagoniste conduit à la diminution spécifique du CTGF et indépendante de l'expression du TGF β . De plus, les expériences *in vitro* indiquent que le traitement de cellules épithéliales tubulaires par le LPA induit la sécrétion par ces dernières du CTGF.

iii. Platelet-derived growth factor : PDGF

Le platelet-derived growth factor (PDGF) est une cytokine très bien caractérisée dans les modèles de pathologies rénales. Synthétisé par les macrophages, il est un puissant facteur de survie et de prolifération des cellules mésenchymateuses (37). A l'heure actuelle, le système du PDGF comprend quatre isoformes, PDGF-A, B, C et D qui se fixent sur des récepteurs à activité tyrosine-kinase homo- ou hétérodimériques composés des sous-unités PDGFR- α et - β (99). Ces protéines ont un rôle physiologique majeur et non redondant puisque les animaux invalidés pour l'une des isoformes A, B ou C meurent en anté- ou en périnatal (99).

Dans la fibrose rénale, le PDGF est fortement impliqué dans la prolifération des cellules mésangiales et la production par ces dernières de protéines de la MEC (100). La stimulation de ces cellules entraîne l'apparition d'une glomérulosclérose. Du côté tubulointerstitiel, une étude démontre que la perfusion de rats avec du PDGF-B provoque la prolifération des cellules interstitielles, l'apparition des myofibroblastes et la fibrose et

que ces signes disparaissent à l'arrêt du traitement (101). Pour ce qui est du PDGF-C, son blocage par des anticorps neutralisants diminue la quantité de fibrose induite par OUU (102). Enfin la neutralisation du PDGF-D par anticorps diminue les atteintes glomérulaires et la FTI secondaire dans un modèle de glomérulonéphrite (103).

En conditions pathologiques, le blocage des récepteurs au PDGF semblerait être une piste intéressante dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. A l'heure actuelle, plusieurs inhibiteurs de l'activité kinase du récepteur ont été testés. Par exemple, chez des rats obstrués, la molécule d'AG1295 retarde l'apparition de la FTI (104). Cependant la spécificité de tels inhibiteurs n'est que partielle et les effets observés sont des effets totaux et pas totalement imputables au blocage de cette cytokine. Le PDGF et ses récepteurs n'en demeurent pas moins des cibles intéressantes afin de ralentir voire bloquer la progression de la fibrose rénale.

iv. Fibroblast growth factor : FGF

La famille des fibroblast growth factor (FGFs) est aujourd'hui composée de 22 membres (105). L'appartenance à cette famille se fait seulement sur les homologies structurales et non fonctionnelles. Ainsi, beaucoup de ces FGFs sont sans effet sur la prolifération des fibroblastes mais peuvent avoir des rôles très divers. Certains de ses membres sont impliqués dans l'angiogenèse, l'hématopoïèse ou encore l'homéostasie métabolique (105).

Dans le rein, deux isoformes du FGF ont été particulièrement étudiées, le FGF-2 et le FGF-23. Chez l'Homme, l'expression du FGF-2 par les cellules interstitielles et tubulaires est corrélée avec la sévérité de la FTI (106). *In vitro*, cette cytokine augmente la prolifération des fibroblastes et leur expression d' α SMA sans toutefois accroître la production des protéines matricielles (106). De plus, sur des cultures de fibroblastes humains, l'effet prolifératif du TGF β passerait en grande partie par la sécrétion et la stimulation autocrine du FGF-2 (107). L'autre FGF étudié dans le rein est le FGF-23. Il est largement étudié pour son implication dans le métabolisme du phosphate et la production de vitamine D (108). En effet, il diminue la production des enzymes qui métabolisent la vitamine D en sa forme active et augmente l'excrétion rénale du phosphate menant ainsi à une hypophosphatémie. Dans les pathologies rénales

chroniques, son expression est corrélée à la sévérité de la pathologie et les modifications de cette expression sont précoces et prédictives du devenir de la fonction rénale (108).

v. Bone morphogenetic protein 7 : BMP7

La famille des bone morphogenetic proteins fait partie de la superfamille du TGF β et est composée de plus de 20 membres (109). Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la croissance, la différenciation ou l'apoptose (110). L'osteogenic protein 1 plus connue sous le nom de BMP-7 est un espoir thérapeutique dans les pathologies rénales. En effet, BMP-7 s'oppose aux effets profibrosants du TGF β . Faisant partie de la même famille, ces deux cytokines partagent des voies de transduction communes, notamment la voie des Smad. En effet, alors que le TGF β induit la phosphorylation des Smad2/3, le BMP-7 induit celle des Smad1/5/8 (111). Ces Smad phosphorylées fixent la protéine Smad commune, Smad4, et sont exportées au noyau (112). Les complexes Smad2/3 – Smad4 et Smad1/5/8 – Smad4 n'auront pas les mêmes cibles. Alors que le complexe Smad2/3 – Smad4 induit l'EMT, le complexe Smad1/5/8 – Smad4 l'inhibe (111). De plus, BMP-7 active la Smad inhibitrice Smad6 (26) qui bloque la phosphorylation de Smad2 (113) due à la fixation du TGF β sur son récepteur.

Le rein représente le lieu de synthèse principal de BMP-7 que ce soit aux stades embryonnaire ou adulte (114). Toutefois, le lieu de synthèse de BMP-7 dans le néphron est encore discuté. Une étude de 2002 chez des souris exprimant la β -galactosidase sous contrôle du promoteur de BMP7 établit qu'elle est exprimée dans le canal collecteur, l'anse ascendante fine, le tubule distal et les podocytes, mais qu'elle est absente du tubule proximal (115). Une autre étude cinq ans plus tard réalise un marquage immunohistochimique de BMP-7 sur des biopsies humaines et affirme que les tubules proximaux seraient marqués. Toutefois, les photographies de l'article ne permettent pas de se faire une idée claire car, à l'inverse de la première étude, aucun co-marquage n'est effectué. Au final, même si l'expression de BMP-7 dans le tubule proximal reste à démontrer clairement, cette cytokine est exprimée dans différentes structures du néphron.

Dans le modèle d'OUU, le traitement de rats par BMP-7 un jour avant l'induction de la pathologie réduit les effets de l'obstruction. Les reins des animaux traités

présentent une inflammation et une fibrose réduites et une fonction rénale préservée (116). Toujours dans l'OUU, une autre étude traite des rats 5 jours après l'obstruction, à la levée de cette dernière. Après cinq jours de traitement, la fibrose et le débit de filtration glomérulaire sont améliorés en comparaison des animaux non traités (117).

vi. Hepatocyte growth factor : HGF

A l'origine, l'hépatocyte growth factor ou HGF a été caractérisé pour ses effets sur la régénération du foie, ce qui lui a valu son nom. Quelques années plus tard, de nombreuses publications ont révélé des effets de l'HGF sur les épithélia d'autres organes tels que le placenta, les poumons, les dents, les glandes mammaires et le rein (118). De ce fait, la nomenclature de cette cytokine est très réductrice tant au niveau de la fonction que du lieu d'action.

Le récepteur à activité tyrosine kinase du HGF est la protéine codée par le proto-oncogène c-Met. Ce récepteur est bien connu en cancérologie car il peut être sujet à des mutations menant à son auto-activation. Ces mutations sont à l'origine de nombreux cancers. Le couple HGF/c-Met induit de très larges effets mitogéniques, motogéniques, morphogéniques et anti-apoptotiques (118). Au niveau des organes, le HGF est proangiogénique (118). *In vitro*, sur des cellules tubulaires cultivées en matrice de collagène, le HGF permet la formation de tubules (119) et joue un rôle dans la tubulogenèse embryonnaire (118). De plus, il est un facteur de différenciation pour les cellules mésenchymateuses du métanéphros (119). A l'âge adulte, le HGF est un puissant facteur anti-apoptotique et prolifératif (118-121). Au vu de ces effets, certains auteurs voient l'HGF comme l'exact opposé du TGF β , allant même jusqu'à parler de Yin et Yang et postulent que la balance d'expression HGF/TGF β conditionnerait le devenir des lésions (120). En effet, sur l'EMT, l'apoptose et la prolifération des cellules épithéliales tubulaires, le TGF β et l'HGF ont des propriétés diamétralement opposées. Ceci peut s'expliquer en partie par les voies de signalisation de ces deux cytokines puisque l'HGF peut bloquer la voie des Smad induite par le TGF β (120).

Ces effets laissent penser que l'HGF pourrait être un traitement de choix dans les pathologies rénales caractérisées par une perte de cellules tubulaires et par leur dédifférenciation. Chez la souris, le potentiel thérapeutique du HGF a été évalué dans le

modèle d'OUU. Le traitement de souris obstruées par un anticorps neutralisant accélère la progression de la FTI alors que l'administration de la protéine HGF recombinante réduit la progression des lésions rénales (122). Une autre équipe a travaillé sur le mode d'administration de la cytokine. Plutôt que d'injecter directement la protéine, ils proposent de transfecter un vecteur codant pour cette dernière dans le muscle de rats (123). Ces plasmides sont enrobés dans des liposomes qui autorisent le passage de l'ADN dans les cellules. Comme dans les travaux précédents, la surexpression de cette cytokine réduit l'inflammation, l'apparition des myofibroblastes et la FTI. Ces études montrent l'effet protecteur du HGF lors du développement de la pathologie mais il restait à prouver son efficacité sur une FTI déjà installée. Lorsque l'administration du HGF débute trois jours après l'induction de la pathologie, on retrouve ces effets bénéfiques. Il bloque la progression des marqueurs d'inflammation ou de fibrose sans toutefois, réduire leurs taux observés au début du traitement (124).

c. Myofibroblastes

Toutes les cytokines que nous venons de voir régulent de façon positive ou négative les phénomènes conduisant à l'apparition des myofibroblastes, cellules responsables de la synthèse excessive de MEC. La quantité de ces cellules dans le tissu est corrélée à la quantité de protéines de MEC accumulées. Les myofibroblastes ont des origines cellulaires très diverses (125). Ils peuvent être issus de l'activation des fibroblastes rénaux interstitiels, de la dédifférenciation des cellules épithéliales tubulaires par un processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) ou des cellules endothéliales par un processus de transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT). Enfin ils peuvent se différencier à partir de cellules précurseurs circulantes appelées fibrocytes ou encore de cellules périvasculaires appelées péricytes.

i. Une cellule...

Le myofibroblaste est une cellule décrite pour la première fois dans le début des années 70 (126). Lors de sa description, les auteurs mettaient en avant pour ces cellules, les propriétés sécrétoires des fibroblastes, mais également les propriétés contractiles des

cellules musculaires lisses. Ces propriétés découlent de l'observation de la contraction et de la cicatrisation des plaies de la peau (127). A ces propriétés fonctionnelles sont associées des caractéristiques structurales et morphologiques. Ces cellules ont une apparence étoilée avec des projections cytoplasmiques importantes (128). Pour leurs fonctions de synthèse de MEC, ces cellules ont un réticulum endoplasmique granuleux ainsi qu'un appareil de Golgi très développés (128, 129) alors que pour leurs fonctions contractiles, elles possèdent des myofilaments périphériques (129) et des Gap junctions leur permettant de communiquer les unes avec les autres (130). Ces Gap junctions permettent aux cellules de synchroniser leur contraction. Une autre caractéristique est l'expression *de novo* de l' α -smooth muscle actin (α SMA) (127-132). Cette protéine du cytosquelette est le marqueur le plus couramment utilisé pour quantifier les myofibroblastes. Toutefois, comme son nom l'indique il est également exprimé par les cellules musculaires lisses. Sur des coupes de reins, les vaisseaux contenant ces cellules seront marqués par un immunomarquage à l' α SMA. Enfin ces cellules sont caractérisées par la présence d'un fibronexus. Cette structure permet d'adhésion cellule-matrice. Les myofilaments sont ancrés à la membrane plasmique et sont prolongés en extracellulaire par des fibres de fibronectine qui elles-mêmes fixent des protéines de collagène (129). Le fibronexus est à la fois un organe de perception de la tension et un activateur de cette dernière. La contraction des myofilaments transmet directement cette force à la MEC via le fibronexus. Quand il est contracté, le myofibroblaste synthétise de nouvelles protéines de MEC qui stabilisent la MEC déjà présente. Ainsi on assiste à une contraction du tissu ou de l'organe en entier (129). Ce fibronexus forme des points focaux d'adhérence "supermaturation" ayant un diamètre de 8 à 30 μ m alors qu'un fibroblaste fait des points focaux dits "classiques" de seulement 2 à 6 μ m (131).

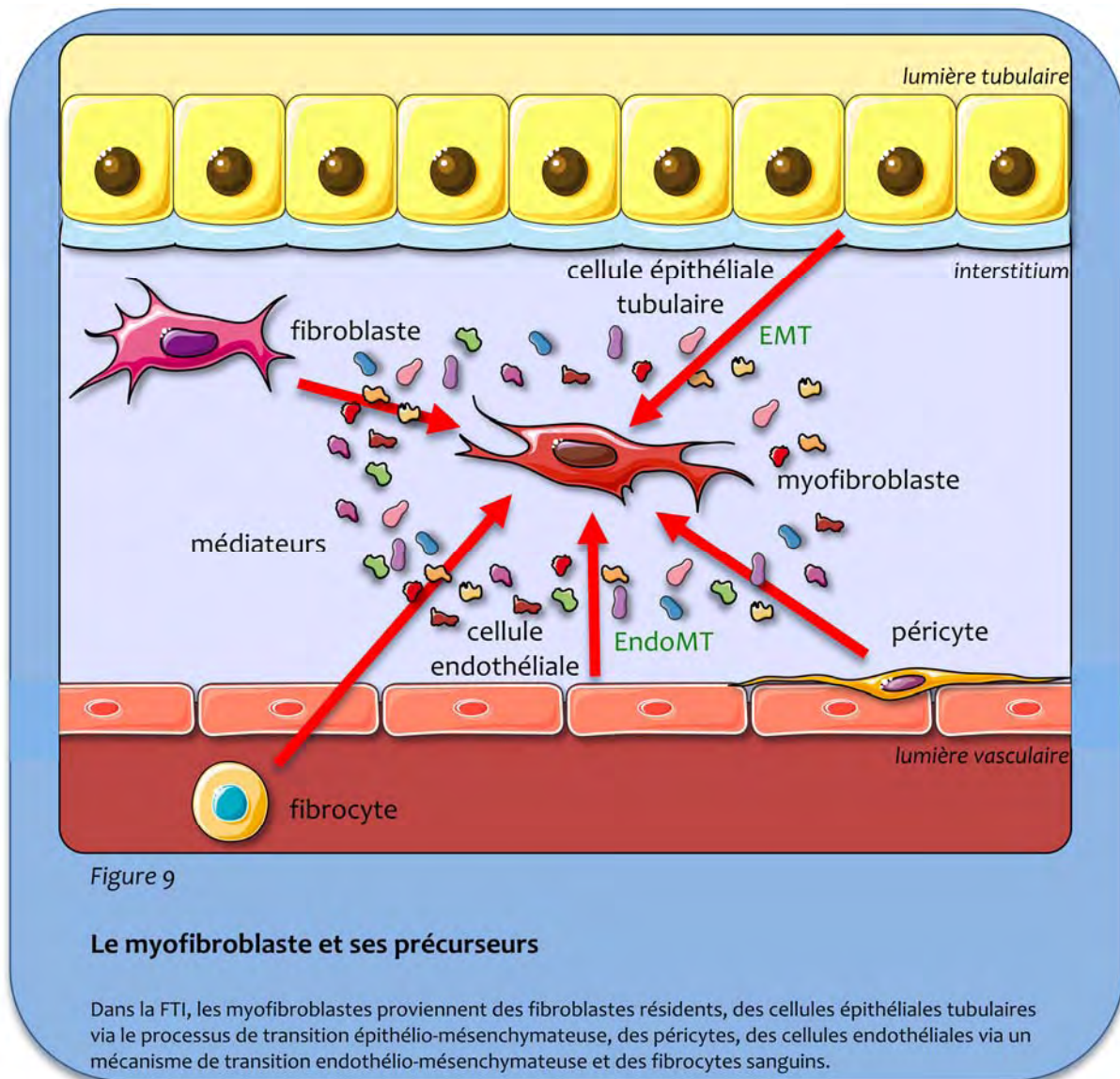
Ces cellules peuvent être issues de très nombreux types cellulaires (détaillés plus bas dans ce chapitre) (127-129, 131, 132). Ceci dénote le rôle indispensable de ces cellules. Lors d'une lésion tissulaire, le but des myofibroblastes est de rapidement restaurer l'intégrité tissulaire en sécrétant et en réorganisant la MEC (127). Ainsi le tissu lésé se collapse évitant ainsi les infections, les saignements et autres fuites de fluides. Toutefois, une cellule ne devient pas un myofibroblaste accompli aussi rapidement. Il existe plusieurs stades de différenciation des myofibroblastes. En effet, entre le fibroblaste et le myofibroblaste mature, se trouve le proto-myofibroblaste (127, 130, 131). Cette cellule

intermédiaire possède des fibres de stress, met en place ses fibronexus et synthétise un variant spécifique de la fibronectine, la fibronectine extra-domaine A (ED-A) (128, 131). Ce variant de la fibronectine est indispensable à la maturation du proto-myofibroblaste. En plus de cette protéine, l'activation de ces cellules nécessite la stimulation par la cytokine décrite précédemment, le TGF β mais également d'un facteur mécanique de tension (127). En effet, il semble que l'environnement régule la différenciation des myofibroblastes. Les fibres de stress apparaissent chez des fibroblastes pour des tensions d'environ 5000 Pa (131). Pour des tensions supérieures, on retrouvera des proto-myofibroblastes qui lorsque la tension dépassera 25 000 Pa exprimeront *de novo* l' α SMA (127). Ces tensions peuvent aller jusqu'à 50 000 Pa dans des plaies cutanées. Enfin, ce serait l' α SMA néo-synthétisée qui permettrait de maintenir la fonction de contraction pour des valeurs de pression si importantes (127). Spontanément, on aurait pu penser que l'absence d' α SMA dans les myofibroblastes conduirait à une perte de fonction de ces cellules. Une étude sur la fibrose rénale montre qu'il n'en est rien et que l'absence d' α SMA augmente même la FTI (133).

Quel est le devenir de ces myofibroblastes ? Lorsque le tissu ou l'organe est stabilisé, les myofibroblastes n'ont plus de raison d'être et entrent en apoptose (130, 131). Bien que les phénomènes précis ne soient pas encore bien élucidés, il semblerait que la diminution de la tension perçue par le myofibroblaste conduise à son apoptose ou à l'inhibition de l'expression de l' α SMA et leur dédifférenciation en fibroblaste (131). Une autre hypothèse serait que l'augmentation de la concentration en myofibroblastes dans un tissu augmente les liaisons cellules-cellules et que ces liaisons inhiberaient les signaux de survie (131). Ce schéma représente le but à atteindre en thérapeutique, toutefois, il existe de nombreux exemples où ces myofibroblastes persistent dans les tissus et conduisent à l'apparition de fibrose et de tissus cicatriciels (130). Une étude indique que le maintien de l'activation de ces myofibroblastes est dû à des modifications épigénétiques (134). En effet, la méthylation de certains gènes répresseurs spécifiques diminue leur expression et maintient l'état d'activation. L'absence d'expression de la méthyltransférase Dnmt1 responsable de ces méthylations diminue la FTI (134). Ceci rajoute un niveau de régulation des myofibroblastes. L'environnement physique, le mélange de cytokines et maintenant des facteurs épigénétiques régulent le niveau d'activation des myofibroblastes et leur survie lors de la résolution de la lésion initiale.

ii. ... Plusieurs origines

Comme nous l'avons vu précédemment le rôle des myofibroblastes dans la sauvegarde d'un tissu ou d'un organe est tel que de très nombreux types cellulaires sont capables de s'activer, se différencier ou se dédifférencier en myofibroblastes (127). Dans le cadre du rein, nous nous intéresserons aux fibroblastes, aux cellules tubulaires, aux cellules endothéliales, aux fibrocytes et aux péricytes.



- Fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules décrites pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle (135). En plus de leur caractéristique de morphologie étoilée, ces cellules sont

surtout caractérisées par défaut. Dans le tissu conjonctif, ce sont les cellules qui ne sont ni épithéliales, ni vasculaires, ni immunitaires (135). Actuellement, il n'existe pas de marqueur idéal et spécifique des seuls fibroblastes, ce qui est un frein majeur à leur étude et à leur localisation dans les tissus sains ou pathologiques. Toutefois, une étude a dressé le profil d'expression génique de cinquante primo-cultures de fibroblastes dermiques humains issus de dix localisations anatomiques (abdomen, prépuce, orteil...) sur seize patients d'âges différents (136). Il s'avère que deux fibroblastes de localisations différentes sont aussi éloignés que deux lignées de cellules immunitaires. Ceci peut s'expliquer par la caractérisation par défaut. En effet, la dénomination fibroblaste regroupe certainement plusieurs types cellulaires distincts. Au vu de ces résultats, il semble de première importance de caractériser la ou les populations de fibroblastes de chaque tissu.

Comme nous venons de le voir, il serait futile d'essayer de décrire les rôles généraux des fibroblastes. Nous nous en tiendrons donc seulement aux fibroblastes rénaux. Dans le rein, les fibroblastes ont pour rôle majeur de synthétiser la MEC des tissus, d'établir des contacts entre les cellules et de maintenir la structure du tissu (137). En effet, ces cellules dégradent et synthétisent la MEC sur laquelle reposent les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (138). La nature des fibres est un régulateur de la fonction cellulaire. Par exemple, on sait que l'expression de ED-A fibronectine conduit à la différenciation des fibroblastes qui y reposent en myofibroblastes (132). En régulant la quantité de cette matrice, les fibroblastes jouent directement sur la fonction du rein. Plus l'espace entre les vaisseaux sanguins et les tubules rénaux est grand, moins les échanges de sécrétion et de réabsorption seront efficaces (138). Enfin, ils ont un rôle sur la structure du rein. En parallèle du tubule rénal, court un vaisseau sanguin qui est maintenu à proximité par le réseau fibreux des fibroblastes (138). Dans le rein sain, les fibroblastes permettent d'optimiser les communications entre les cellules en maintenant la distance et la nature du filtre qui les séparent.

Les fibroblastes seraient les précurseurs "naturels" et logiques des myofibroblastes. Le fibroblaste s'active en myofibroblaste lorsque la tension du tissu qu'il perçoit devient trop importante. Pour une tension inférieure à 2,5 kPa, le fibroblaste reste fibroblaste, lorsque cette tension augmente jusqu'à 10 kPa, il se pré-active en proto-myofibroblaste et pour des tensions supérieures à 25 kPa, il acquiert toutes les

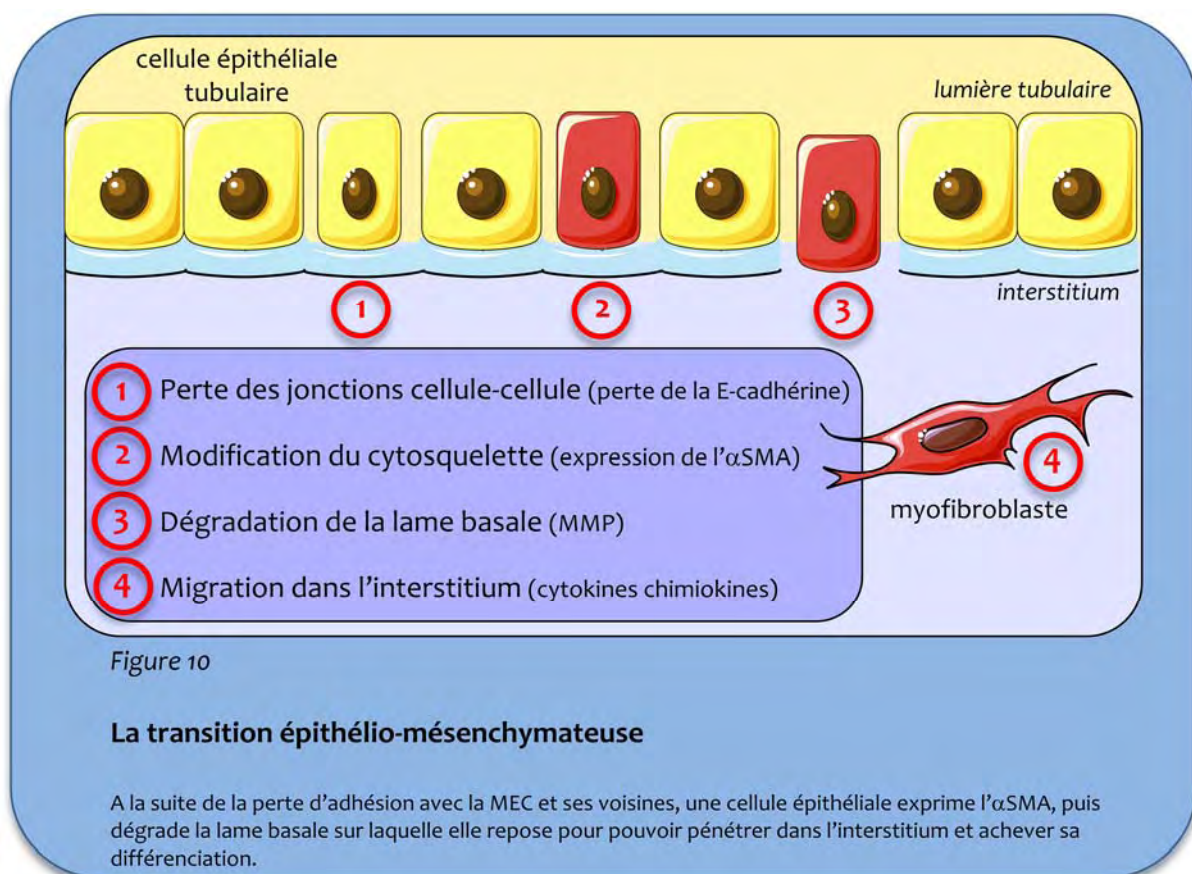
caractéristiques du myofibroblaste et notamment l' α SMA (127). Au final, le fibroblaste tel qu'il vient d'être présenté est peu décrit dans la littérature. Bien souvent, l'amalgame est fait entre fibroblaste et myofibroblaste et de nombreuses études prétendent quantifier les fibroblastes en mesurant l'expression de l' α SMA. Le rein ne fait pas exception à la règle, mais à la lumière des connaissances obtenues sur la physiologie du fibroblaste et du myofibroblaste, il serait intéressant de revoir de nombreux résultats de la littérature afin d'attribuer à chacun leur rôle propre dans les pathologies fibrosantes.

- Cellules épithéliales tubulaires

Dans de nombreux domaines de la biologie, il est connu que les cellules épithéliales peuvent se dédifférencier en cellules mésenchymateuses. Ces cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales (polarisation, jonctions cellules-cellules, E-cadhérine, ZO-1, cytokératine...) et acquièrent des propriétés mésenchymateuses (mobilité, morphologie, production de protéines de la MEC, α SMA, FSP1...) (139-141). Le processus qui mène à cette transformation est appelé transition épithélio-mésenchymateuse (epithelial-to-mesenchymal transition : EMT). Elle se produit dans des conditions physiologiques ou pathologiques. En biologie du développement, il est bien connu que des cellules sont capables de passer, plusieurs fois de suite d'un état épithélial à un état mésenchymateux (139). Ce processus d'EMT de type I (140) est indispensable au développement normal de tous les organes. Lors d'une blessure cutanée, les kératinocytes entrent en EMT afin de permettre l'oblitération de la plaie (139). L'EMT de type II semble occuper une place de premier ordre dans les pathologies fibrosantes et affecte de nombreux organes tels que le foie, le poumon, l'œil, l'intestin et le rein. Enfin l'EMT de type III correspond à la différenciation des cellules néoplasiques qui au cours de leurs divisions perdent leur phénotype épithélial et acquièrent une mobilité (métastase) (140).

Dans les pathologies fibrosantes rénales décrites dans ce manuscrit, seule l'EMT de type II est impliquée. Depuis quelques années, il a été clairement prouvé que des cellules épithéliales tubulaires différenciées, en conditions de stress, pouvaient perdre leur phénotype et se dédifférencier en cellules mésenchymateuses. Ces cellules n'ont que deux devenir possibles, la différenciation en (myo)fibroblaste ou l'apoptose. Un article

récent explique que l'arrêt des cellules épithéliales à la transition G2/M conduit à la FTI par la synthèse de protéines matricielles et de cytokines profibrosantes et que la réactivation du cycle a un rôle protecteur dans cette fibrose (142). En l'absence de prolifération, les cellules tubulaires activent un mécanisme de transition. D'un point de vue mécanistique, ce processus se décompose en quatre étapes. La première consiste en la perte de l'adhésion cellule-cellule au niveau du tubule. S'ensuivent l'expression *de novo* d' α SMA et la réorganisation du cytosquelette d'actine. Par la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMP), les cellules en cours de transition dégradent la lame basale sur laquelle elles reposent et qui les séparent de l'interstitium. Enfin, la résultante de ces trois premières phases permet à ces cellules, qui ne sont plus adhérentes entre elles et à la MEC et qui ont modifié leur cytosquelette, de répondre aux signaux chimioattractants présents dans l'espace interstitiel (141, 143, 144).



L'EMT est dépendante du ratio de cytokines synthétisées. Un déséquilibre en faveur des cytokines profibrosantes (TGF β , CTGF, FGF...) versus antifibrosantes (HGF, BMP7) conduit à la dédifférenciation des cellules épithéliales (81). Cependant, ce processus est réversible si les signaux activateurs ne sont pas maintenus plus de 48

heures (81). Les médiateurs capables d'induire ce processus sont très nombreux et leur liste augmente de jour en jour. Potentiellement, toutes les molécules qui fragilisent les jonctions cellule-cellule, qui induisent un stress (mécanique, chimique...) des cellules, qui modifient ou dégradent la lame basale sur laquelle reposent les cellules... seraient des inducteurs de l'EMT. Toutefois, seul le TGF β est capable d'induire toutes les étapes de cette transition (87). Les autres cytokines citées dans le paragraphe précédent potentialisent les effets du TGF β ou n'agissent que sur quelques unes des quatre étapes décrites. On vient de voir que les molécules capables d'induire l'EMT sont très nombreuses, il n'est donc pas étonnant que les voies de signalisation qui y conduisent, le soient tout autant. Toutefois, trois voies principales se dégagent : la voie de signalisation du TGF β par les Smad, la voie des intégrines et de l'ILK et enfin celle de Wnt et de la β -caténine (141, 143, 145).

Le phénomène d'EMT a été observé dans plusieurs modèles animaux de FTI (144). Dans les modèles d'OUU (87, 146), de néphropathie diabétique (147), de néphrectomie subtotale (148), de glomérulonéphrite induite par sérum néphrotoxique (149) et de rejet d'allogreffe chronique (150), les auteurs ont montré que cette transition était un processus intervenant dans l'apparition des myofibroblastes. Dans l'obstruction, l'EMT serait à l'origine de 36 % des myofibroblastes alors que les fibroblastes résidents ne seraient impliqués qu'à 15 % (146). Ces résultats confirment que les cellules épithéliales seraient une source non négligeable de myofibroblastes dans le développement de la FTI.

Cependant, certaines études remettent en question ce phénomène *in vivo* (151). Par des approches d'animaux exprimant spécifiquement la β -galactosidase dans les cellules épithéliales tubulaires, les auteurs montrent qu'aucune activité galactosidasique n'est retrouvée dans les cellules interstitielles. Selon cette étude, une cellule épithéliale tubulaire ne pourrait pas se différencier en myofibroblaste.

- Cellules endothéliales

En parallèle de l'EMT, a été décrit le concept de transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT). Tout comme pour les cellules épithéliales, cette transition consiste en la perte des marqueurs endothéliaux et l'acquisition de nouveaux marqueurs mésenchymateux. Ce phénomène a été tout d'abord caractérisé *in vitro* sur des cultures

primaires de cellules endothéliales d'aorte ou d'artère pulmonaire bovines (152). Comme pour l'EMT, l'endoMT a un rôle dans le développement de nombreux organes tel que, par exemple, le pancréas (153).

La première évidence de l'implication de ce phénomène dans un processus fibrosant a été apportée par une étude sur la fibrose cardiaque (154). La co-expression d'un marqueur endothélial, CD31, et d'un marqueur (myo)fibroblastique, Fsp-1, révèle la dualité de ces cellules et permet de les repérer dans un tissu. Cependant, dans cette étude, les auteurs ne quantifient pas la proportion de myofibroblastes issus de cette EndoMT mais décrivent que les stimuli menant à cette transition sont les mêmes que pour l'EMT. En effet, le TGF β induit la dédifférenciation alors que le BMP-7 l'inhibe (154). Des études sur le rein ont suivi et dévoilent également, dans différents modèles, l'implication de l'EndoMT dans la FTI. Un joli travail a été réalisé en parallèle sur trois modèles de FTI et quantifie le nombre de cellules interstitielles provenant de cette transition (155). Pour cette quantification, les auteurs expriment les pourcentages en fonction du taux de cellules Fsp-1 positives (fibroblastes + myofibroblastes) et α SMA positives (myofibroblastes). Dans l'OUU, 36 % des fibroblastes et 25 % des myofibroblastes sont issus de l'EndoMT alors que dans un modèle de maladie d'Alport, ce sont 45 % et 60 %, respectivement qui proviennent de ce phénomène (155). Dans un modèle de néphropathie diabétique induite par la streptozotocine, deux études identifient les cellules endothéliales comme source conséquente de myofibroblastes et ce, précocement (156) ou plus tardivement (155) dans le développement des lésions. Six mois après l'induction de cette néphropathie, les cellules endothéliales sont à l'origine de 40 % des cellules Fsp-1 positives et de 50 % des cellules α SMA positives (155). Au vu de ces résultats, ce processus récemment caractérisé est de premier ordre puisqu'il est à l'origine de 30 à 50 % des (myo)fibroblastes selon les modèles de néphropathies. Les similitudes avec l'EMT devraient faciliter l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'EndoMT. Cependant, les cellules endothéliales ayant des propriétés intrinsèques particulières, cette transition doit avoir des voies de transduction spécifiques. Bloquer cette transition permettrait d'une part, de réduire l'accumulation de myofibroblastes et de la FTI qui en découle et d'autre part, de diminuer les phénomènes ischémiques et hypoxiques en limitant la raréfaction capillaire retrouvée dans les atteintes rénales.

- Fibrocytes

Les fibrocytes sont des cellules issues de la moelle osseuse. Ces cellules précurseurs appartiennent à la lignée hématopoïétique et possèdent des caractéristiques à la fois des cellules souches hématopoïétiques (CD34, CD45), des monocytes (CD11b, CD14, CD80, CD86) et des fibroblastes (collagène de type I, fibronectine, vimentine, MMP9) (157, 158). Elles expriment également de nombreux récepteurs aux chimiokines, des CCR comme des CXCR, ce qui leur permet de répondre à un très large panel de chimiokines (158). Dans le rein, une étude souligne que le couple CCL21/CCR7 serait responsable du recrutement des fibrocytes dans un modèle de néphropathie obstructive (159). La neutralisation par anticorps de cette chimiokine diminue l'influx de fibrocytes dans le tissu et a pour conséquence, une réduction de la fibrose. Les auteurs proposent cette chimiokine comme nouvelle cible thérapeutique. D'autres protéines sont impliquées dans le recrutement de ces fibrocytes dans l'interstitium rénal. L'angiotensine II, bien connue pour son implication dans la FTI, régule, via ses récepteurs AT1 et AT2, l'entrée des fibrocytes (160). Alors que l'AT1 augmenterait leur influx, l'AT2 le diminuerait. Ces deux études établissent que les fibrocytes sont une source de myofibroblastes non négligeable dans le développement de la FTI.

- Péricytes

Originellement, les péricytes étaient les cellules bordant les capillaires sanguins de tous les organes (161). Leur nom est dû à la localisation mais ne reflète pas leurs fonctions. De ce fait, ce "groupe" cellulaire d'"en-contact-avec-l'endothélium-cytes" est composé de plusieurs types cellulaires. Ce n'est que récemment que ses différents constituants ont été identifiés (162). Il contient les cellules musculaires lisses vasculaires exprimant l' α SMA et les péricytes à proprement parler (162). Ces dernières représentent une infime partie des "en-contact-avec-l'endothélium-cytes". Les péricytes ont des propriétés proches des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (161). En effet, elles sont capables de se différencier en cellules musculaires lisses, en adipocytes, en chondrocytes, en ostéoblastes ou, pour ce qui nous intéresse ici, en (myo)fibroblastes (162). Ces cellules multipotentes ont un rôle dans la régénération

tissulaire puisqu'elles sont présentes dans tous les organes et qu'elles ont des potentialités de différenciation et de sécrétion importantes. En effet, l'injection de ces cellules dans le muscle, l'os ou la peau permet de régénérer ces organes (162). Toutefois après la greffe, peu de chimérisme est observé ce qui laisse penser que ces cellules auraient un rôle bénéfique, plus par leurs sécrétions et leurs effets para ou juxtacrine que par leurs propriétés de précurseurs cellulaires (162).

Dans le rein, une étude démontre que les péricytes sont à l'origine de la plus grande partie des myofibroblastes apparaissant après obstruction urétérale (163). En effet, par des techniques de modélisation mathématique visant à déterminer la durée du cycle cellulaire, les auteurs en concluent que les cellules interstitielles synthétisant le collagène de type I ont un cycle de 45 heures. Ceci exclut la possibilité que ce soit des fibrocytes qui ont un cycle plus court. De plus, ils notent une co-localisation de marqueurs péricytaires (NG2) et myofibroblastiques (α SMA) laissant penser que les myofibroblastes proviendraient des péricytes. Deux jours après OUU, 60 % des cellules exprimant le gène du collagène I seraient issus des péricytes. Dans une autre étude (151), la même équipe utilise des animaux exprimant le gène Lac-Z uniquement dans les cellules de la lignée mésenchymateuse, c'est-à-dire, les cellules mésangiales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les péricytes alors que les cellules épithéliales et endothéliales ne l'expriment pas. Quatorze jours après ligature d'un uretère, la quasi-totalité des myofibroblastes (α SMA+) est positive pour la β -galactosidase. Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale (151). Cette étude remet en question toutes les études présentées dans les paragraphes précédents et seules les études à venir permettront de trancher quant à l'origine des myofibroblastes rénaux...

- Conclusion

Le myofibroblaste est la principale cellule responsable de l'accumulation de la MEC dans la FTI. Ceci fait de cette cellule une cible de choix dans le traitement de la FTI. Pour cela, une meilleure compréhension de son origine était indispensable. Le fibroblaste, la cellule épithéliale, la cellule endothéliale, le fibrocyte ou le péricyte sont autant de précurseurs potentiels. De nombreuses études tendent à prouver ou infirmer que telle ou telle cellule est prépondérante dans ce processus. A l'heure actuelle, il est difficile, à mon

sens, de se faire une idée tranchée. Les différentes écoles ont leurs arguments valables, mais les techniques, les modèles animaux, les cinétiques... sont très différents d'une étude à l'autre. Toutefois, c'est la somme d'arguments apportés par différentes études qui permet de valider une hypothèse. Si l'on récapitule les données obtenues dans le modèle d'obstruction, on s'aperçoit que les myofibroblastes dérivent à 36 % de cellules épithéliales (146), à 36 % de cellules endothéliales (155), à 15 % de fibroblastes (146) et à 100 % de péricytes (151). Ceci nous fait un total de 187 % sans compter ceux provenant des fibrocytes !!! Il faudrait que sur le même échantillon, l'on puisse quantifier le co-marquage de l' α SMA avec les marqueurs de tous ces précurseurs possibles. Ainsi, tous les biais empêchant de comparer les études entre elles seraient nuls et l'on pourrait obtenir un début de réponse quant à l'origine des myofibroblastes.

d. Accumulation de matrice extracellulaire

La troisième et dernière étape de la mise en place de la fibrose est l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Comme pour de nombreux, si ce n'est tous, processus physiologiques, il existe une homéostasie de la MEC. En conditions normales, la MEC est en équilibre ce qui sous-tend que la synthèse de nouvelles molécules compense la dégradation d'autres constituants. Lors de la pathologie, cet équilibre peut être rompu par l'augmentation de la synthèse de néo-protéines et/ou par la diminution de la dégradation. A ce versant quantitatif, s'ajoute une composante qualitative (164). En effet, les cellules étant en interaction directe avec la MEC sur laquelle elles reposent, une modification des éléments qui composent ce réseau matriciel, entraîne une variation des signaux cellulaires induits. Par exemple, dans le chapitre précédent, nous avons vu que l'expression de la l'ED-A fibronectine induit l'activation des fibroblastes en myofibroblastes (132). La MEC est un mélange complexe de molécules de protéoglycanes, fibronectine, élastine, laminine et collagènes (35). La proportion entre ces constituants est variable d'un tissu à l'autre et évolue au cours du temps. On peut citer en exemple de cette évolution, la MEC dermique, qui au cours du vieillissement s'appauvrit en élastine à l'origine de l'élasticité de la peau et à l'inverse s'enrichit en collagène qui est une protéine plus rigide (165). Au niveau de l'organisme, cela se caractérise par l'apparition de rides.

Nous envisagerons les différents constituants ainsi que les acteurs intervenant dans l'accumulation de cette MEC pour enfin évaluer l'impact et les conséquences de cette fibrose sur le tissu rénal.

i. Les constituants de la matrice extracellulaire

La MEC est un assemblage de différentes molécules constituant une structure en trois dimensions. Initialement elle a été considérée comme inerte, remplissant les espaces vides et ne servant qu'à maintenir une structure et protéger le tissu contre les tensions mécaniques. Il est maintenant bien admis que cette matrice est une structure dynamique qui génère des signaux contrôlant l'activité des cellules qui elles-mêmes peuvent en réponse modifier la composition de cette MEC (164, 166).

- Les protéines

La MEC est composée de très nombreuses protéines, toutefois, nous nous cantonnerons, ici, aux principales.

Collagène

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes (25 % des protéines totales) chez les mammifères (167). La famille des collagènes contient 28 membres classés en collagènes fibrillaires (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII), collagènes associés aux fibrilles (VII, IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII), collagènes formant des réseaux (IV, VI, VIII, X), collagènes transmembranaires (XIII, XVII, XXIII, XXV), collagènes précurseurs d'endostatine (XV, XVIII) ou enfin en collagènes n'appartenant à aucune des catégories listées (XXVI, XXVIII) (168). La molécule de collagène est un homo ou hétérotrimère de chaînes α enroulées sur tout ou partie de leur séquence (168). Dans le rein en conditions physiologiques, les collagènes formant des réseaux sont les principaux composants de la membrane basale alors que les collagènes fibrillaires sont peu exprimés (167). Les myofibroblastes décrits plus hauts sont des cellules capables de synthétiser de grandes quantités de protéines matricielles et notamment les collagènes fibrillaires de types I et III.

De plus, les cellules ont des comportements différents en fonction des types de collagène sur lesquels elles reposent. Par exemple, le collagène IV est un signal de survie pour les cellules épithéliales alors que le collagène I n'est pas capable d'induire ce type de réponse cellulaire (81).

Laminine

Les laminines sont des protéines hétérotrimériques (sous-unités α , β , γ) les plus abondantes dans la membrane basale (169). Elles jouent le rôle de pont entre les cellules et les protéines fibrillaires et les autres laminines de la MEC. L'exemple le plus parlant de leur importance est l'épidermolyse bulleuse, pathologie pour laquelle, la peau n'adhère pas correctement à la membrane basale et lors d'un frottement des lambeaux entiers de peau se détachent (169). En effet, des mutations de la laminine sont à l'origine de cette pathologie. Tout comme le collagène IV, les laminines sont des signaux de survie pour les cellules épithéliales (81).

Fibronectine

La fibronectine est une grande glycoprotéine impliquée dans de nombreux mécanismes physiopathologiques. Cette protéine est composée de deux monomères similaires liés par deux ponts disulfures dans leur partie C-terminale (170) et codés par un seul gène mais le transcrit primaire peut subir de nombreux épissages alternatifs (171). Il existe au milieu de la séquence, deux domaines appelés extra-domaines A ou B (ED-A ou ED-B) qui peuvent être ou non épissés, conduisant à quatre variants de fibronectine. La fibronectine ne contenant ni ED-A ni ED-B est la fibronectine présente dans le plasma et synthétisée par les hépatocytes. Elle joue un rôle dans la formation du thrombus. Cette forme correspond à une forme adulte. A l'inverse, au cours du développement et en conditions physiopathologiques, les formes ED-A et/ ou ED-B sont réexprimées (171). Comme nous l'avons vu dans un chapitre précédent, le variant ED-A joue un rôle important dans l'activation des myofibroblastes. En effet, ce variant synthétisé par les myofibroblastes et activateur de ces derniers est impliqué dans la cicatrisation, l'accumulation de MEC et la différenciation cellulaire. Le mécanisme à l'origine de la modification de l'épissage du transcrit en conditions pathologiques n'est pas connu à

l'heure actuelle. Au niveau de leur fonction au sein de la MEC, comme les laminines, la fibronectine est un pont entre les cellules et la MEC sous-jacente (170).

Dans la fibrose rénale, pour les deux caractéristiques citées précédemment, la fibronectine est un outil d'investigation très important. En effet, elle est le reflet de l'accumulation de MEC et donc de la FTI mais elle permet également d'avoir un aperçu de l'état d'activation des myofibroblastes. De nombreuses études (172, 173) dont les nôtres (174, 175) décrivent l'augmentation de la fibronectine dans la FTI.

- Les protéoglycanes

Les protéoglycanes représentent moins de 10 % du poids des protéines fibreuses mais occupent la très large majorité de l'espace interstitiel (176). Ils sont composés de polymères de disaccharides sulfatés appelés glycosaminoglycanes (GAG) liés de façon covalente à un corps protéique (176-178). Les radicaux sucrés peuvent constituer jusqu'à 95 % du poids total de la molécule de protéoglycane. Les radicaux sulfates présents sur les sucres confèrent à la molécule une charge négative nette très importante qui conduit à l'attraction de cations (Na^+) et d'eau. Ainsi la molécule aura un encombrement stérique très important et forme un gel. Ce gel permet la diffusion des nutriments et autres solutés du liquide interstitiel. De plus, à l'inverse des protéines fibrillaires qui sont résistantes aux forces d'étirement, les protéoglycanes sont résistants aux forces de compression (176). Ces deux types de molécules sont intimement liés puisque les protéoglycanes enrobent les autres constituants de la MEC et ensemble, forment un maillage moléculaire résistants aux différentes forces physiques pouvant s'exercer sur un tissu (177).

Au vu des caractéristiques décrites ci-dessus, ces molécules ont un rôle de filtre. Le meilleur exemple est la fente de filtration glomérulaire dans laquelle ces molécules et plus particulièrement le perlecan fixent la porosité du maillage (176). Ces protéoglycanes régulent l'activité et la biodisponibilité de nombreuses protéines sécrétées par les cellules. En effet, ils peuvent immobiliser les protéines sur leur lieu de sécrétion et éviter leur dispersion, ils peuvent bloquer leur activité par encombrement stérique, ils peuvent aussi constituer un réservoir de protéines qui seront libérées ultérieurement, et enfin ils peuvent protéger les protéines de l'action de protéases. Un exemple bien connu est la

fixation de facteurs de croissance à la MEC libérés lors d'une modification de l'environnement (dégradation de la MEC, sécrétion d'enzyme activatrice de la proforme du facteur de croissance...). Pour ce qui est du TGF β , une étude conclut que les protéoglycanes à héparane sulfate seraient responsables de l'adsorption du TGF β latent sur les molécules de fibronectine (179). Cette interaction le stabilise et le rend disponible pour une utilisation ultérieure. Enfin un dernier rôle sur lequel nous reviendrons plus tard dans ce manuscrit est la mise en place d'un gradient de chimiokines. Ces molécules synthétisées par une cellule stressée se fixent sur les molécules de la MEC, mettant ainsi en place un gradient chimique de concentration nécessaire au chimiotactisme et au recrutement de cellules immunitaires (176).

ii. Les acteurs et modulateurs

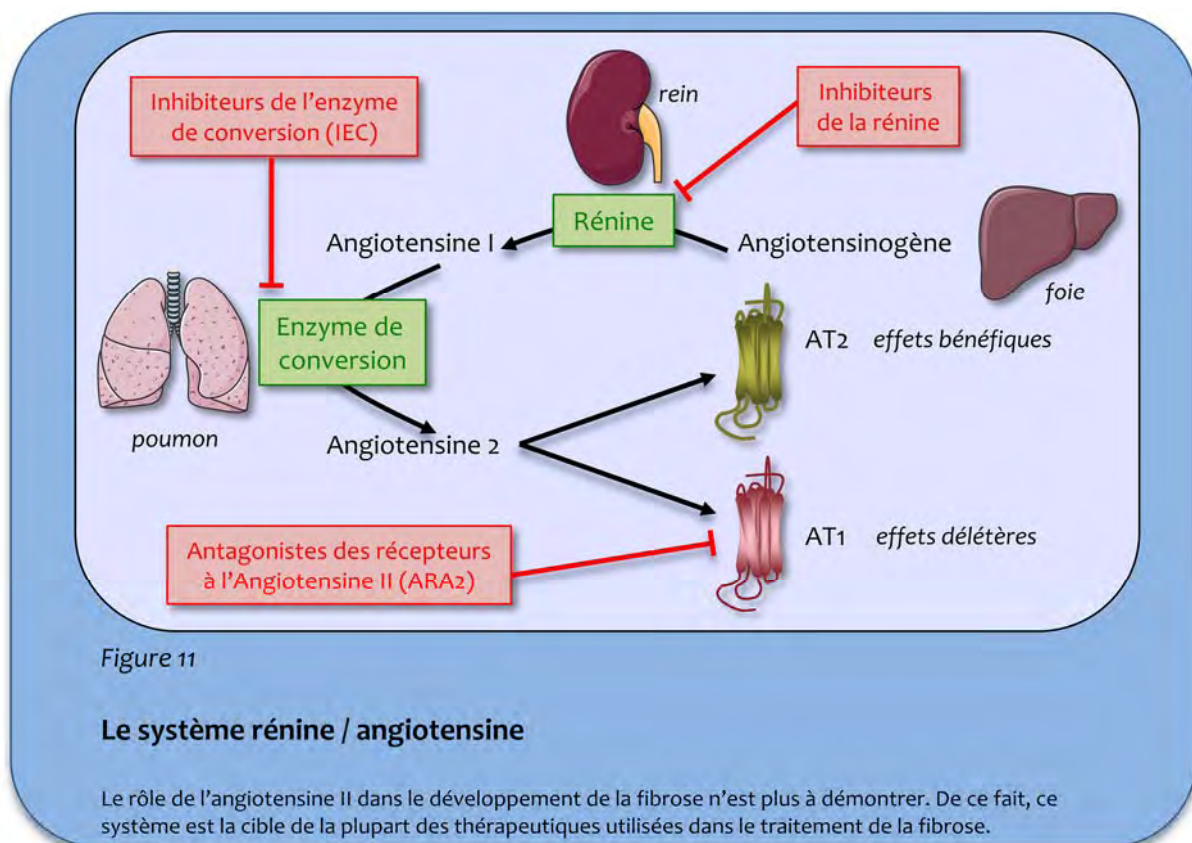
Nous venons de détailler la nature et la structure de cette matrice. Dans les pages qui suivent, nous détaillerons certaines des molécules capables d'induire la synthèse, la dégradation ou la stabilisation de la MEC.

- Système Rénine/Angiotensine (SRA)

Ce système est sans doute le plus important dans le développement de la FTI. Très tôt, il a été identifié pour son implication dans ces pathologies et actuellement, la quasi-totalité de l'arsenal thérapeutique vise à bloquer son activité (180). Il existe deux composantes de ce système : le système classique circulant représenté sur le schéma et le système tissulaire ou local (181). Les deux systèmes font intervenir les mêmes enzymes et conduisent aux mêmes produits. Bien que d'autres formes d'angiotensine (Ang III, Ang IV...) puissent avoir des activités biologiques (181), l'angiotensine II (Ang II) est la molécule historique la plus décrite pour son implication dans les processus fibrosants pathologiques. L'Ang II se lie à deux récepteurs couplés aux protéines G appelés AT₁ et AT₂ (180-182). Bien que l'effet global de l'injection d'Ang II soit l'augmentation de la pression sanguine, de nombreux autres effets ont été décrits pour ses récepteurs. L'AT₁ induit la vasoconstriction, la soif, les sécrétions d'hormone anti-diurétique (ADH) et d'aldostérone, la fibrose, la production de radicaux libres oxygénés, la croissance

cellulaire et la migration alors que l'AT₂ induit la vasodilatation, la production de monoxyde d'azote (NO) et inhibe la croissance cellulaire (181).

L'Ang II est impliquée dans toutes les étapes conduisant à la fibrose. De ce fait, elle aurait tout aussi bien pu être présentée dans les chapitres précédents. La fixation de l'Ang II sur ses deux récepteurs active la voie du NFκB (183), voie de signalisation inflammatoire qui conduit à l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM) impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires. De plus, l'Ang II a des effets pro-apoptotiques sur les cellules épithéliales et endothéliales rénales (184, 185). Enfin, cette hormone stimule l'expression de la cytokine profibrosante, le TGFβ décrite précédemment pour ses effets prolifératifs sur les fibroblastes et activateurs de la synthèse des protéines de la MEC (186). L'Ang II stimule également l'expression d'une autre cytokine, le CTGF, via des mécanismes TGFβ dépendants et indépendants (187). Tout ceci entraîne la prolifération des fibroblastes et l'augmentation de la synthèse de protéines de la MEC (188).



Le système rénine/angiotensine est la cible de nombreux médicaments visant à améliorer les atteintes rénales. La plus ancienne classe est celle des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) avec la découverte du Captopril en 1970 (189). Cette classe

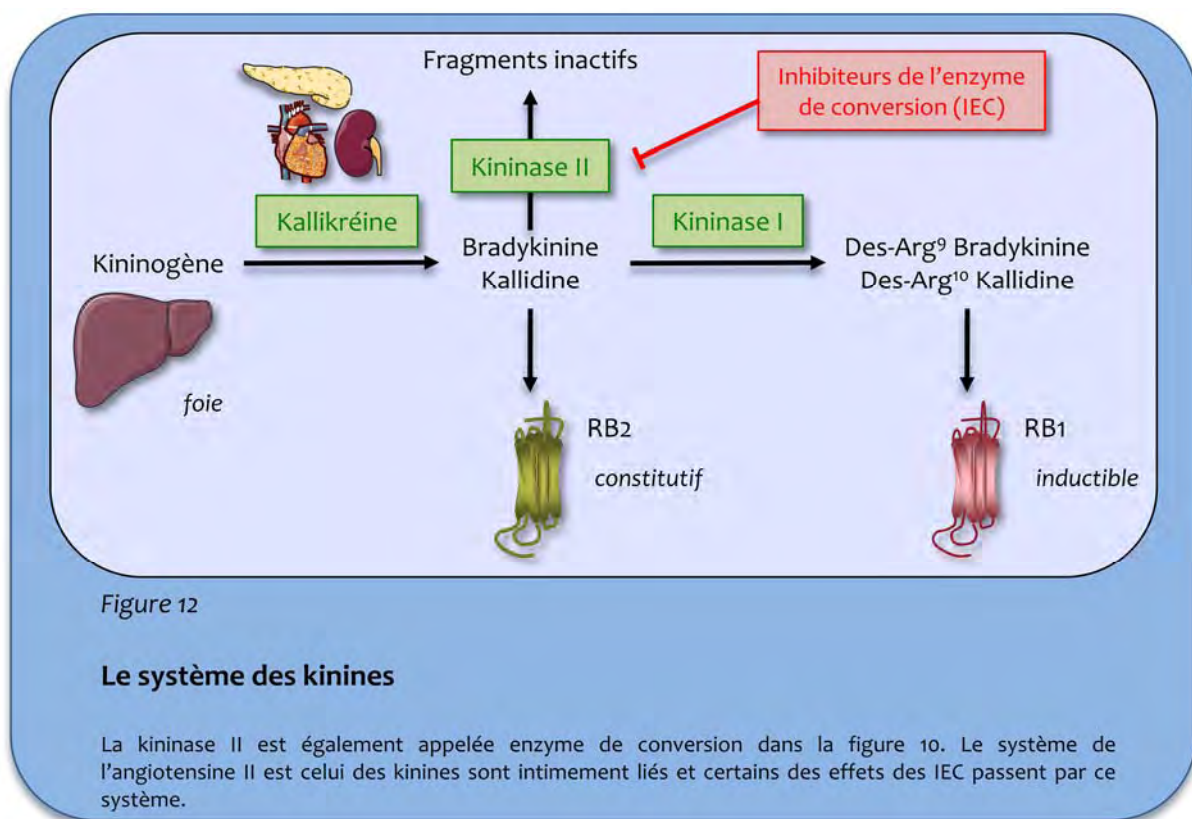
bien qu'efficace et toujours utilisée à l'heure actuelle (enalapril, ramipril, benazepril...), présente certains inconvénients. En effet, il existe des voies enzymatiques alternatives permettant la métabolisation de l'Ang I en Ang II. De plus, ces inhibiteurs déclenchent des hyperkaliémies, de la toux et de l'angioedème (189). Au vu de ces inconvénients, la recherche a voulu bloquer le système en aval et a ainsi développé des antagonistes des récepteurs 1 à l'Ang II (les ARA2 : losartan, valsartan, irbesartan...) (189). Les résultats obtenus avec ces molécules ont présenté des résultats intéressants et surprenants. L'analyse de l'effet du blocage du récepteur AT1 a révélé qu'une partie des effets bénéfiques passait par l'augmentation de la stimulation de l'AT2 (190). Des recherches sont menées actuellement afin d'identifier des agonistes AT2 et d'évaluer leurs effets. Le composé 21 est en cours d'étude et permettra d'évaluer les bénéfices de cette nouvelle et potentielle classe de molécules (191). Basée sur l'observation que les bithérapies IEC/ARA2 augmentent les taux circulants de rénine ce qui conduit à un échappement thérapeutique, l'hypothèse inverse a été formulée, comme quoi, le blocage du système en amont serait plus efficace ou tout du moins complémentaire. La cible était donc la rénine, enzyme limitante du système. Pour cela, l'inhibiteur Aliskiren a été développé. Encore testé sur le long cours, chez les patients, les résultats préliminaires ont prouvé que cet inhibiteur, seul ou combiné à un ARA2, pouvait réduire la protéinurie des patients (17).

Le rôle du système rénine/angiotensine n'est plus à démontrer même si ce système n'a pas encore révélé toute sa complexité. Pour le traitement de la FTI, les principales molécules thérapeutiques visent ce système. Toutefois, leurs effets ne sont pas totaux et laissent de la place pour de nouvelles cibles.

- Système Kinine/Kallikréine (SKK)

En parallèle du système rénine/angiotensine, se trouve le système kinine/kallikréine. En effet, ces deux voies partagent une enzyme clé qui est l'enzyme de conversion aussi appelée kininase II pour son rôle dans le système des kinines (192). Le précurseur de ces peptides est le kininogène synthétisé au niveau hépatique et relargué dans la circulation. Ce peptide est clivé une première fois par une enzyme découverte dans le pancréas, organe auquel elle doit son nom de kallikréine. Les produits de cette

dégradation sont la bradykinine (BK) et la kallidine (Lys-BK). Ces peptides ont trois devenir possibles. Premièrement, ils se fixent sur le récepteur B2 des kinines (RB2) pour lequel ils sont particulièrement affins et qui médie leurs effets. Ils peuvent être soumis à une lyse par la kininase II qui mène à la formation de fragments peptidiques sans activité biologique connue. Enfin, ils peuvent subir un clivage de l'acide aminé arginine en position 9 par la kininase I. Ceci conduit à la production de des-Arg⁹ Bradykinine (DBK) et de des-Arg¹⁰ Kallidine (Lys-DBK). Ces ligands ont une activité biologique médiée par un autre récepteur, le récepteur B1 (RB1). Comme on l'a dit, ce système partage l'enzyme de conversion avec le système rénine/angiotensine. Lorsque l'enzyme de conversion est inhibée par des IEC afin de diminuer les taux d'Ang II, la dégradation de la BK est également inhibée, conduisant à l'augmentation des taux circulants des kinines. Cette augmentation permet d'expliquer certains effets bénéfiques obtenus par traitement aux IEC et qui ne sont pas attribuables au SRA.



Comme pour les récepteurs à l'Ang II, les deux récepteurs couplés aux protéines G des kinines ont des effets et des propriétés d'expression très différents. Alors que le RB2 est constitutivement exprimé dans la plupart des tissus, le RB1 n'est que peu ou pas exprimé en conditions physiologiques, mais fortement présent en conditions

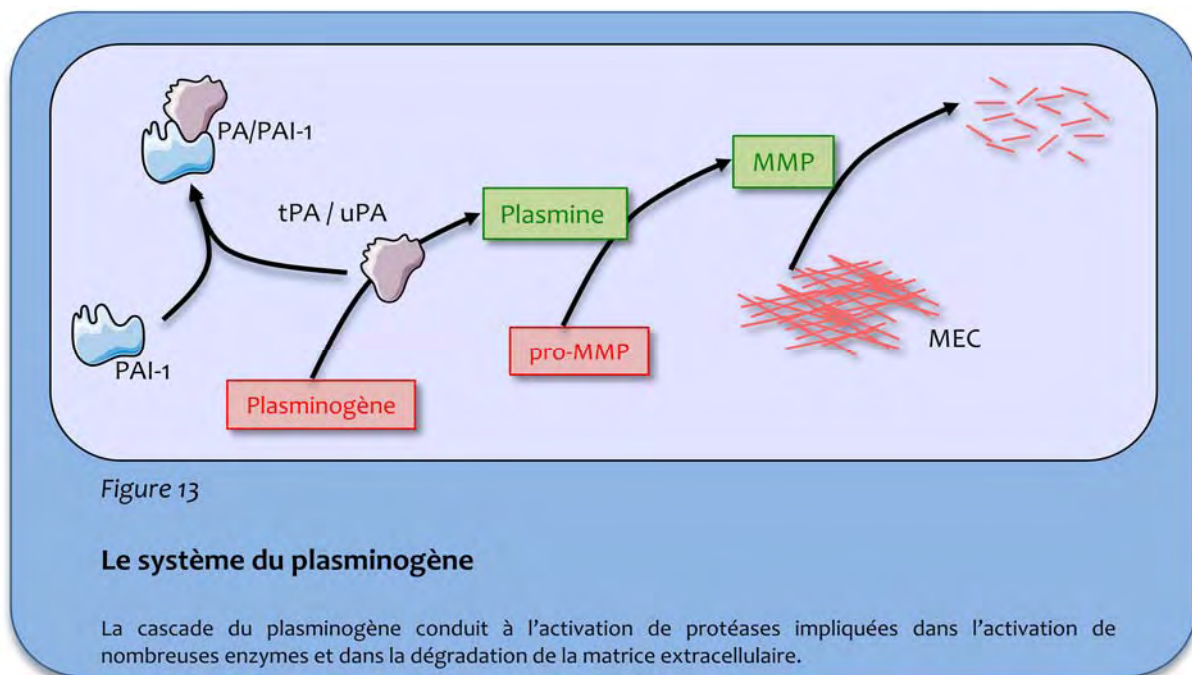
pathologiques comme l'inflammation, le diabète, les atteintes d'ischémie/reperfusion ou l'absence du RB2 (193). Via ces récepteurs, les kinines sont impliquées dans des processus physiologiques (donc via le RB2) comme les régulations de la pression sanguine, et des fonctions rénales et cardiaques, et dans des processus pathologiques (majoritairement via le RB1) comme l'inflammation. Ces effets sont obtenus principalement par la production de NO et de prostaglandines conduisant à la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire (194). Le traitement de l'hypertension par des IEC augmente donc la vasodilatation kinine dépendante associée à la diminution de la vasoconstriction Ang II dépendante. Plusieurs études établissent que les effets bénéfiques des IEC sont en partie dus à l'augmentation des kinines (195-197).

Toutefois, les effets inflammatoires et l'expression strictement pathologique du RB1 ont laissé penser qu'il pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des pathologies rénales chroniques. A l'aide de souris invalidées pour ce récepteur et d'antagonistes spécifiques du RB1, l'équipe s'est attachée à mettre en évidence le potentiel thérapeutique du blocage de ce récepteur. Dans un modèle d'OUU, nous avons mis en évidence que le blocage génétique du RB1 protégeait de l'apparition de FTI, mais, résultat plus intéressant, que l'antagoniste non peptidique SSR240612 administré quotidiennement sur une FTI déjà installée permettait de réduire l'accumulation de MEC (198). L'effet du blocage du RB1 se retrouve sur l'expression des chimiokines et cytokines, de l'inflammation et sur l'accumulation de myofibroblastes. L'OUU ayant fourni la preuve de concept du rôle du RB1 dans la FTI, nous nous sommes intéressés ensuite à un modèle de glomérulonéphrite induite par anticorps anti-membrane basale, modèle chronique de néphropathie (199). Dans ce modèle aussi, l'antagonisme du récepteur même lorsque la pathologie est déjà installée, réduit les lésions tissulaires, la FTI et améliore la fonction rénale. De plus, l'analyse rétrospective de l'expression du RB1 chez des patients a mis en évidence une forte surexpression dans des tissus malades en comparaison avec des tissus sains. Tous ces résultats font ressortir le bénéfice dû au blocage de ce récepteur dans les néphropathies.

Pour résumer sur les pathologies rénales, les SRA et SKK sont intimement liés. Le SRA est délétère et le SKK serait bénéfique via le RB2 et délétère via le RB1. Pour cela, il serait intéressant d'évaluer les effets d'une bithérapie IEC/antagoniste RB1.

- Système du plasminogène

Ce système est certainement le plus complexe de tous ceux que l'on a pu évoquer précédemment. Le système du plasminogène est une série de protéases qui s'activent en cascade par clivage protéolytique. L'enzyme clé de ce système est la plasmine qui a la capacité de dégrader des protéines matricielles telles que la fibronectine, la laminine ou le perlécan. Elle permet également le clivage et l'activation des pro-MMPs en MMPs. Les MMPs (voir chapitre suivant) sont les enzymes spécialisées dans la dégradation de la MEC. Ainsi la plasmine, dans une situation de fibrose, semble être bénéfique pour la résolution de cette dernière. Toutefois, il n'en est rien. La dégradation des protéines de la lame basale permet la migration des cellules épithéliales dans l'interstitium et favorise ainsi l'EMT. De plus, cette enzyme est un puissant activateur du TGF β latent en TGF β mature. Enfin en activant le récepteur PAR-1 présent à la surface des cellules épithéliales, elle est un inducteur de l'EMT (200).



De nombreux résultats ont été obtenus grâce aux animaux invalidés pour les différents constituants de ce système. Les résultats sont divers mais il semble toutefois ressortir une indépendance entre ces composants, remettant en cause la cascade présentée ici. Même si chaque élément prend place dans la succession de réactions, leurs activités "annexes" sont telles que l'on se doit de les envisager en tant qu'acteur à proprement parler.

Le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) est le premier élément de la cascade synthétisé principalement par le foie et le tissu adipeux. Le PAI-1 se lie avec l'urokinase type plasminogen activator (uPA) et le tissu type plasminogen activator (tPA) bloquant ainsi leur activité catalytique d'activation du plasminogène (200-202). De plus, PAI-1 se lie également à une protéine de la MEC, la vitronectine. Le PAI-1 et les cellules seront en compétition pour la fixation à la vitronectine ce qui conduira à une fragilisation de l'adhésion cellule/MEC à l'origine de l'EMT (200). Cet inhibiteur est quasiment indétectable en conditions physiologiques et fortement surexprimé lors de nombreuses pathologies ce qui fait de lui une cible de choix permettant d'éviter au maximum les effets secondaires d'un blocage systémique. Dans le rein, des expériences menées sur le modèle d'obstruction urétérale unilatérale ont montré que des souris déficientes en PAI-1 étaient partiellement protégées de l'inflammation, de l'apparition des myofibroblastes et de l'apparition de la FTI (203). Il est important de noter que les activités de la plasmine et de l'uPA ne sont pas modifiées par l'absence du PAI-1. Ceci laisse penser que les effets délétères de PAI-1 sont indépendants de la cascade du plasminogène. Le pendant de cette étude était de regarder l'effet de la surexpression du PAI-1. La même équipe met en évidence que les souris transgéniques ont une inflammation et une fibrose exacerbées et que, cette fois-ci, ceci s'accompagne d'une réduction de l'activité de l'uPA (204). Un mutant de cette protéine n'inhibant pas le PA a été développé. Son administration à des souris dans des modèles de glomérulonéphrite ou de néphropathie diabétique permet de réduire les lésions fibrotiques et d'améliorer la fonction rénale (205, 206).

Dans ce cadre là, au laboratoire, nous avons testé des leurres se fixant sur PAI-1 et empêchant sa liaison aux PA (207). Dans le modèle d'OUU et lorsqu'ils sont administrés trois jours après l'induction de la pathologie, ces leurres sont capables de réduire l'accumulation de protéines de la MEC sans modifier l'inflammation et l'accumulation de myofibroblastes (174). Le blocage du PAI-1 permet de restaurer l'activité catalytique des PA mais les protéines se situant en aval dans la cascade (plasmine, MMP-2, MMP-9) ne subissent pas de modulation de leur activité. Encore une fois, les effets observés seraient indépendants de la cascade du plasminogène. Cependant, les leurres du PAI-1 augmentent légèrement, mais de façon significative, l'expression de l'HGF dont nous avons précédemment évoqué l'effet antifibrosant. Dans l'étude sur les animaux invalidés pour le PAI-1 (203), une réduction de l'inflammation et de l'accumulation de

myofibroblastes est observée alors qu'avec les leurres nous n'en observons pas. Ceci peut s'expliquer par le fait que les leurres ne bloquent que le site de fixation aux PA et pas celui à la vitronectine. Cette fixation à la MEC peut être responsable de l'effet chimiotactique et expliquerait la différence entre ces deux études. Toutefois, ce mécanisme devra être mieux caractérisé afin de différencier les effets médiés par PAI-1.

- Les MMP, TIMP et transglutaminases...

Les métalloprotéases matricielles sont une classe d'enzymes responsables de la dégradation de la MEC. Elles tirent leur nom de la présence d'un ion de Zinc dans leur structure et comportent 23 membres chez l'Homme (208). Elles sont synthétisées en l'état de pro-forme appelée zymogène qui après clivage donne la forme active et peuvent être pour certaines d'entre elles ancrées à la membrane plasmique par des domaines protéiques transmembranaires ou par une ancre lipidique (208). En dégradant les protéines de la MEC, elles ont des rôles extrêmement variés (208). Elles peuvent conduire à la génération de fragments de dégradation appelés matrikines et ayant les propriétés des cytokines (récepteurs, voies de signalisation...). En effet, la dégradation du collagène XVIII libère un fragment appelé endostatine qui est un puissant inhibiteur de l'angiogénèse. Ces MMP peuvent modifier la structure d'un tissu ou d'un organe en permettant par exemple la formation de métastases. Elles interviennent également dans la régulation des cytokines et facteurs de croissance. La dégradation de la matrice libèrera le TGF β latent (84) ou encore, la rupture du domaine transmembranaire de l'HB-EGF conduira au relargage de l'EGF. Ensuite, comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les collagènes, la nature des collagènes de la membrane basale contribue au devenir de la cellule (81). Enfin, elles ont comme substrats de nombreuses chimiokines. La métabolisation par les MMP de CXCL8 conduit à son activation alors que celle de CCL2 mène à son inactivation. Ainsi les MMP orientent la réponse immunitaire en régulant la balance des chimiokines. Des actions aussi diverses et parfois contradictoires laissent présager que l'implication de ces MMP dans les pathologies ne pourra pas être envisagée de façon manichéenne. Pour exemple, une étude signale que des cellules stimulées par l'HGF augmentent leur production de MMP2 et MMP9, inhibent celle de TIMPs et par voie de conséquence réduisent l'accumulation de MEC (148). Deux autres études montrent

que MMP2 (209) et MMP9 (85) sont capables d'induire l'EMT sur des cellules épithéliales tubulaires. La surexpression de MMP2 chez la souris est corrélée à l'induction de la FTI (84, 209). Ces résultats présentent les effets bénéfiques d'une part et néfastes d'autre part obtenus pour les mêmes MMPs. Tous ces acteurs intervenant dans le renouvellement et/ou la stabilisation de la MEC ont des effets tellement divers et souvent contradictoires, que la probabilité à moyen terme d'obtenir une thérapeutique les ciblant est faible.

De plus, toutes ces enzymes possèdent des inhibiteurs endogènes appelés *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) (210). Ces inhibiteurs sont au nombre de quatre chez les vertébrés et ont une structure permettant leur fixation sur le site actif du domaine catalytique des MMPs (211). Leur présence ajoute un niveau de complexité à la régulation de l'activité des MMPs.

Enfin à l'inverse des MMPs qui dégradent la MEC, les transglutaminases la stabilisent en formant des liaisons covalentes entre les différentes protéines matricielles rendant ainsi ce réseau résistant à la dégradation (212). Sur des cellules en culture stressées par de fortes concentrations en glucose, l'inhibition de la *tissue transglutaminase* (tTG) réduit l'accumulation de collagènes (213). Ceci a été confirmé récemment *in vivo* dans un modèle de néphropathie diabétique (214). Une explication de ces effets est fournie dans le modèle d'OUU où l'expression de la tTG est corrélée aux taux de TGF β mature (215). Tous ces résultats laissent penser que l'inhibition de la tTG serait une bonne stratégie dans le traitement des pathologies fibrosantes.

iii. Les conséquences

L'accumulation de la MEC a des répercussions sur la forme de l'organe aussi bien que sur son fonctionnement.

- Structurales

La modification majeure de la structure du rein est une contraction de l'organe et une réduction du volume total. En effet, les myofibroblastes se contractent et tirent sur

les fibres de collagènes (35). Dans les stades terminaux, la totalité des structures néphroniques sont remplacées par du tissu fibreux.

- Fonctionnelles

L'accumulation et la contraction de la MEC est la première cause de l'oblitération des capillaires, l'atrophie tubulaire et la progression de l'insuffisance rénale (34). En effet, l'oblitération des capillaires réduit la vascularisation, créant ainsi un phénomène ischémique et hypoxique majeur. De plus, l'augmentation de la quantité de MEC éloigne les tubules de leurs vaisseaux nourriciers. Les cellules déjà agressées par la modification de composition de leur membrane basale ne peuvent résister à ces stress et entrent en apoptose, en EMT ou comme le prouve une étude récente, afin de se protéger ou comme alternative à l'apoptose, activent un processus d'autophagie (216). La perte d'unités fonctionnelles conduit à la perte de fonction rénale.

Le système des chimiokines

"Ben si, si c'est l'même volume sonore, on dit "équidistant" [...] S'ils sont équidistants en même temps que nous, on peut repérer le dragon par rapport à une certaine distance. Si le dragon s'éloigne, on s'ra équidistant, mais ça s'ra vachement moins précis et... et pas réciproque."

Perceval, Kaamelott, Livre I, "La fureur du dragon"

1. Historique de la chimiotaxie

a. De la communication à la chimiotaxie...

Lorsque l'on regarde autour de nous, la nature regorge d'exemples de communications. Chaque être vivant communique avec ses semblables, les autres espèces et son environnement. La somme des informations obtenues dans ces échanges est intégrée et conduit à une réponse.

Lorsqu'un troupeau d'animaux devient trop grand, ses différents membres entrent en compétition pour avoir accès à la nourriture. La fertilité d'organismes malnutris diminue et régule ainsi la taille du troupeau. L'autre réponse possible consiste à évaluer les ressources de l'environnement afin de migrer vers des prairies plus vertes. Si l'on fait le parallèle avec la biologie cellulaire, des cellules qui croissent, entrent en compétition pour les facteurs de croissance solubles et entrent en contact les unes avec les autres favorisant ainsi une inhibition de contact. Ces deux mécanismes conduisent à l'arrêt de la prolifération. Sur le versant pathologique, les cellules tumorales échappent à ces mécanismes régulateurs et, afin de survivre, synthétisent des facteurs proangiogéniques augmentant l'apport de nutriment et en cas de métastases, des cellules migrent spécifiquement vers des régions de l'organisme qui leur seront favorables et permettront le développement d'une tumeur secondaire.

Dans le règne végétal, lors de sa croissance, un arbre puise toujours plus loin dans le sol afin de trouver les nutriments et l'eau nécessaires à sa croissance. Cette croissance est orientée tout comme celle de l'axone des neurones qui innervent les tissus périphériques.

Enfin, dans la savane, lorsqu'une antilope perçoit la présence d'un félin par son odeur, elle fuit. Pour éviter cela et se dissimuler, le félin se placera toujours à contre-sens du vent. Ainsi ces deux animaux adaptent leur localisation en fonction des perceptions qu'ils ont l'un de l'autre. Un parallèle peut être fait entre une cellule infectée par un virus et une cellule immunitaire. Un virus infectant une cellule est reconnu comme étranger et induit le recrutement des cellules du système immunitaire. Afin de se protéger, certains virus inhibent la production du CMH de classe I de la cellule qu'ils infectent. Cela rend le système immunitaire aveugle à leur présence à l'intérieur de la cellule.

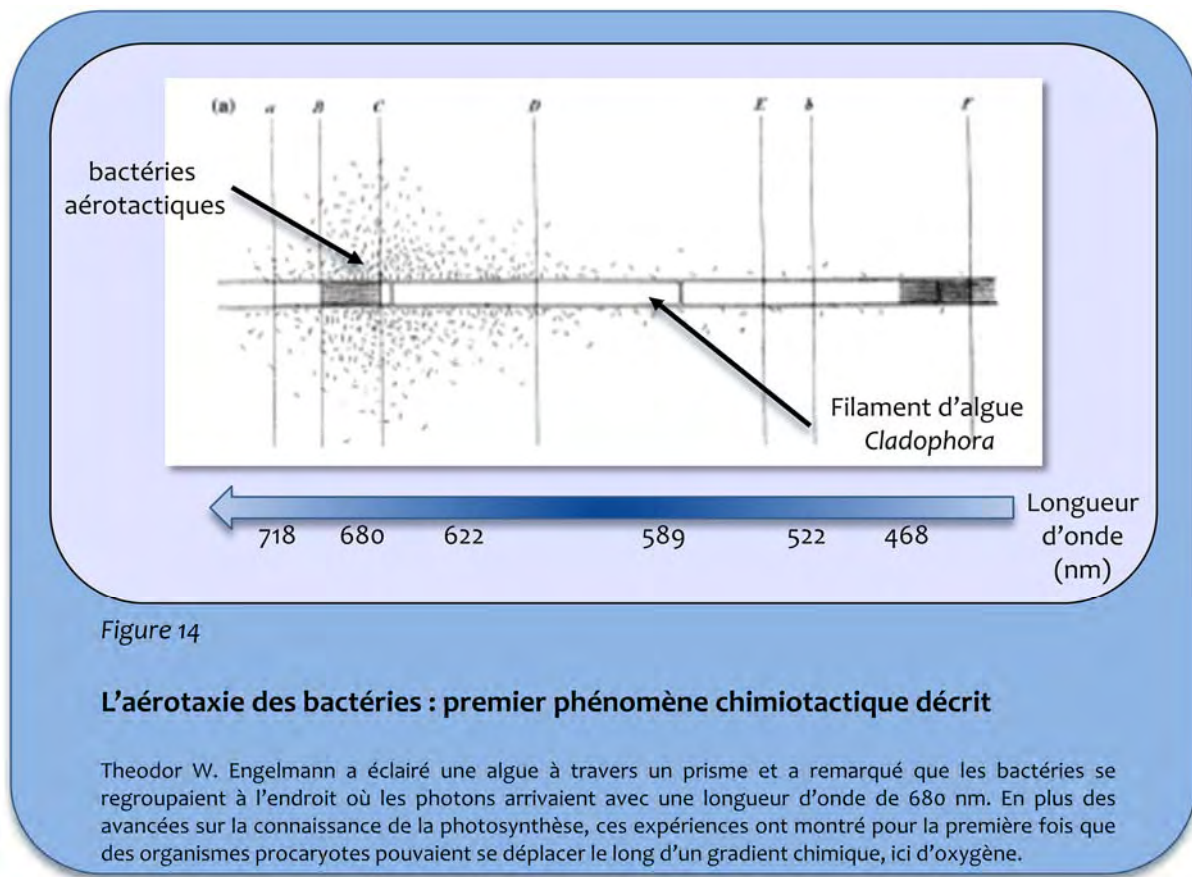
Ces exemples montrent que dans la nature, de l'organisme pluricellulaire supérieur au procaryote, l'une des réponses les plus fréquentes est la mobilité. De même que des cellules peuvent s'attirer ou se repousser, les organismes entiers font de même.

Chez l'Homme, plusieurs études ont essayé de rationaliser l'attirance d'un être vers un autre. Celle-ci ne serait pas uniquement dictée par l'apparence ou tout autre paramètre physique ou comportemental mais également par la stimulation de récepteurs par de petites molécules volatiles appelées phéromones (217). En effet, lorsqu'une personne doit choisir entre plusieurs T-shirts ayant été portés par des personnes différentes, son choix se porte préférentiellement vers le vêtement de la personne possédant un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ni trop semblable ni trop différents du sien (218). Il est connu que l'association de CMH trop différents ou trop proches conduit à des organismes ayant une immunité imparfaite. Ces travaux laissent penser que l'attirance entre deux personnes serait là pour conduire à une progéniture la plus forte au niveau de ses défenses immunitaires. Dans cette théorie, ces phéromones et la complémentarité génétique remplacent la flèche de Cupidon et l'amour n'est plus un phénomène complexe et mystérieux mais la résultante d'un processus physiologique rationnel.

La perception de signaux chimiques par une cellule ou un organisme entraînant une mobilité est la définition de la chimiotaxie. Les illustrations précédentes relèvent d'une chimiotaxie, nutritive pour les premières et olfactive pour les suivantes. Cependant le terme de chimiotaxie est plus généralement utilisé au niveau cellulaire aussi bien pour les procaryotes que pour les eucaryotes.

b. ... De la chimiotaxie aux chimiokines

La notion de chimiotaxie a été avancée pour la première fois par Theodor W. Engelmann en 1881 (219). Il avait remarqué que des bactéries aérobies se déplacent pour se mettre en contact direct avec un organisme produisant de l'O₂. Ce phénomène d'attrait par l'oxygène appelé aérotaxie est aujourd'hui regroupé dans la chimiotaxie.



Ce n'est qu'en 1898, que le parallèle a été fait avec la physiologie animale. W.T. Councilman (220) propose que l'accumulation de cellules immunitaires dans le tissu rénal pourrait être dû à la sécrétion par le tissu rénal de substances chimioattractantes. Cette hypothèse a été vérifiée vingt ans plus tard par deux études de E.P. Wolf. Dans la première (221), elle montre l'effet de différentes substances (sels de sodium, de potassium, acides, sucres, acides aminés, alcool...) sur la migration de cellules immunitaires humaines *in vitro*. Ces substances sont divisées en substances chimioattractantes positives, négatives ou neutres. Dans la seconde étude (222), les mêmes substances sont testées mais, cette fois-ci, *in vivo*. Des injections intra-péritonéales sont réalisées sur des souris et des grenouilles, et l'accumulation de cellules immunitaires dans le péritoine est quantifiée.

Vers la fin des années 80, plusieurs protéines comme CXCL4 (PF4) (223) ou CXCL10 (IP10) (224) sont identifiées dans des phénomènes inflammatoires mais leurs propriétés chimioattractantes restent inconnues. C'est la découverte de CXCL8 (IL8) (225), CCL2 (MCP1) (226, 227) et de CCL3 et CCL4 (MIP1 α et β) (228) qui pour la première fois met en évidence des protéines chimioattractantes spécifiques de certains types cellulaires. Ces

petits médiateurs protéiques appartiennent à la famille des cytokines qui, de par leur action chimioattractantes, ont été nommées « chemoattractant cytokines » : chemokines ou chimiokines en français.

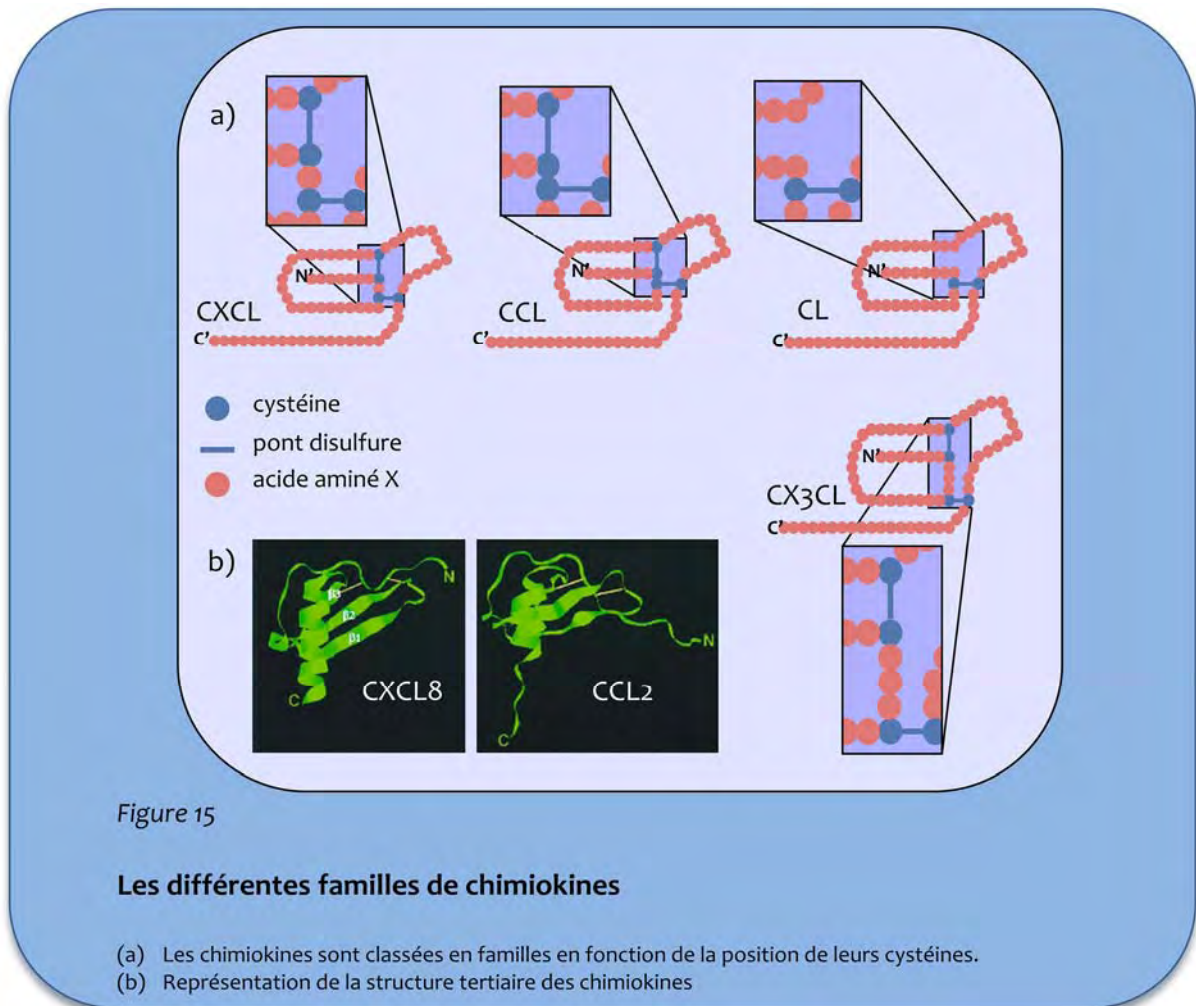
Dans les années qui suivirent de nombreuses autres chimiokines furent découvertes, portant leur nombre à une cinquantaine. Outre leur rôle dans l'inflammation, les chimiokines et surtout leurs récepteurs furent identifiés comme co-récepteur du VIH. CCR5 permet l'infection des macrophages (229, 230) et CXCR4 (appelé à l'époque de sa découverte « fusin ») permet l'infection des lymphocytes T CD4⁺ (231) par le virus du VIH. Consécutivement à ces découvertes, la recherche sur cette famille de protéines et leurs récepteurs prit son essor, permettant la découverte de très nombreux effets immunitaires ou non, d'antagonistes naturels ou de synthèse. A l'heure actuelle, le monde des chimiokines ne nous a pas encore livré tous ses secrets et nous promet encore de belles avancées.

2. Les chimiokines...

Ces protéines aux caractéristiques chimioattractantes sont pour la plupart, si ce n'est toutes, issues d'un gène ancestral (232). En 1989, CXCL8 (IL-8) fut la première à être découverte (233) et rapidement d'autres suivirent. Au vu du nombre croissant de chimiokines, il a fallu définir ce qu'était une chimiokine en fonction de sa structure ou de sa fonction. De plus ces protéines ayant des noms tous très différents, cela rendait la visibilité de cette famille très difficile. Une nomenclature a été mise en place dans le début des années 2000.

a. Structure

Les chimiokines sont de petites protéines de 68 à 127 acides aminés (7 à 14 kDa) mais la plupart ont une taille comprise entre 70 et 80 acides aminés. Elles contiennent quatre (ou trois) cystéines dont la position dans la chaîne détermine la famille à laquelle elles appartiennent. La position des deux premières cystéines de la chimiokine a permis de regrouper les chimiokines en quatre familles (234).



i. CXCL (Cys-X-Cys Ligand) ou α

Ces protéines possèdent un acide aminé quelconque situé entre les deux premières cystéines. Le représentant le plus connu de cette famille est CXCL8 plus communément appelé interleukine 8 (IL8).

ii. CCL (Cys-Cys ligand) ou β

Les premières cystéines de ces chimiokines sont directement accolées. Le prototype de cette classe est CCL2 ou Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

iii. CL (Cys ligand) ou γ

Ces chimiokines ne possèdent qu'une cystéine en N-terminal, n'autorisant ainsi la formation que d'un seul pont dissulfure.

iv. CX₃CL (Cys-X-X-X-Cys Ligand) ou δ

Le seul membre de cette famille a trois acides aminés présents entre les deux cystéines en position N-terminale. Cette chimiokine (235) de 397 acides aminés, CX₃CL1 aussi appelée neurotactine ou fractalkine est également la seule à posséder un domaine transmembranaire qui l'ancre à la membrane plasmique. Lorsqu'elle se lie à son récepteur CX₃CR1, cette chimiokine dans sa forme entière joue le rôle de molécule d'adhésion (236). Sous sa forme clivée et soluble, comme les autres chimiokines, elle sera chimiotactique.

b. Classification

Avant 2000, la nomenclature des chimiokines se faisait au bon vouloir des personnes qui les mettaient en évidence. Ainsi les liens et les similitudes entre les protéines ne sautaient pas aux yeux. Pour s'en persuader il suffit de regarder les noms courants de toutes les chimiokines dans le tableau suivant. Qui pourrait dire que l'IL8 et PF4 ou encore MCP-1 et RANTES ont des effets et des structures similaires ? A l'inverse, au premier abord, ne semble-t'il pas évident que CXCL8 et CXCL4 ou CCL2 et CCL5 ont de nombreux points communs ?

Ce constat a mené à la création d'une nomenclature systématique de toutes les chimiokines proposée par Zlotnik en 2000 (232). Les noms se composent du nom de la famille à laquelle la chimiokine appartient et un numéro. Ainsi l'IL-8 est devenue CXCL8 et MCP-1, CCL2. Toutefois, les mauvaises habitudes ont la vie dure et des publications récentes utilisent toujours les noms courants perpétuant ainsi la mauvaise lisibilité du système des chimiokines.

Famille		Nom officiel	Nom courant	Récepteur
CCL	β	CCL1	I-309	CCR8
		CCL2	MCP-1	CCR2
		CCL3	MIP-1α	CCR1-5
		CCL4	MIP-1β	CCR5
		CCL5	RANTES	CCR1-3-5
		CCL6	C10	CCR1
		CCL7	MCP-3	CCR1-2-3
		CCL8	MCP-2	CCR3
		CCL9	MIP-1γ	?
		CCL10	CCL10	?
		CCL11	Eotaxin-1	CCR3
		CCL12	MCP-5	CCR2
		CCL13	MCP-4	CCR2-3
		CCL14	CC-1	CCR1
		CCL15	Leukotactin-1	CCR1-3
		CCL16	LEC	CCR1
		CCL17	TARC	CCR4
		CCL18	PARC	?
		CCL19	ELC	CCR7
		CCL20	LARC	CCR6
		CCL21	SLC	CCR7
		CCL22	MDC	CCR4
		CCL23	MPIF-1	CCR1
		CCL24	Eotaxin-2	CCR3
		CCL25	TECK	CCR9
		CCL26	Eotaxin-3	CCR3
		CCL27	CTACK	CCR10
		CCL28	MEC	CCR3-10

Famille		Nom officiel	Nom courant	Récepteur
CXCL	α	CXCL1	GROα	CXCR1-2
		CXCL2	GROβ	CXCR2
		CXCL3	GROγ	CXCR2
		CXCL4	PF4	CXCR3
		CXCL5	ENA-78	CXCR2
		CXCL6	GCP-2	CXCR1-2
		CXCL7	NAP-2	CXCR2
		CXCL8	IL-8	CXCR1-2
		CXCL9	MIG	CXCR3
		CXCL10	IP-10	CXCR3
		CXCL11	I-TAC	CXCR3
		CXCL12	SDF-1	CXCR4
		CXCL13	BCA-1	CXCR5
		CXCL14	BRAK	?
		CXCL15	Lungkine	?
		CXCL16	CXCL16	CXCR6
		CXCL17	VCC-1	?

XCL	γ	XCL1	Lymphotactinα	XCR1
		XCL2	Lymphotactinβ	XCR1

CX3CL	δ	CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1
-------	---	--------	-------------	--------

Figure 16

Nomenclature des chimiokines

Classification des chimiokines avec nom officiel et nom usuel ainsi que les récepteurs qui médient leurs effets.

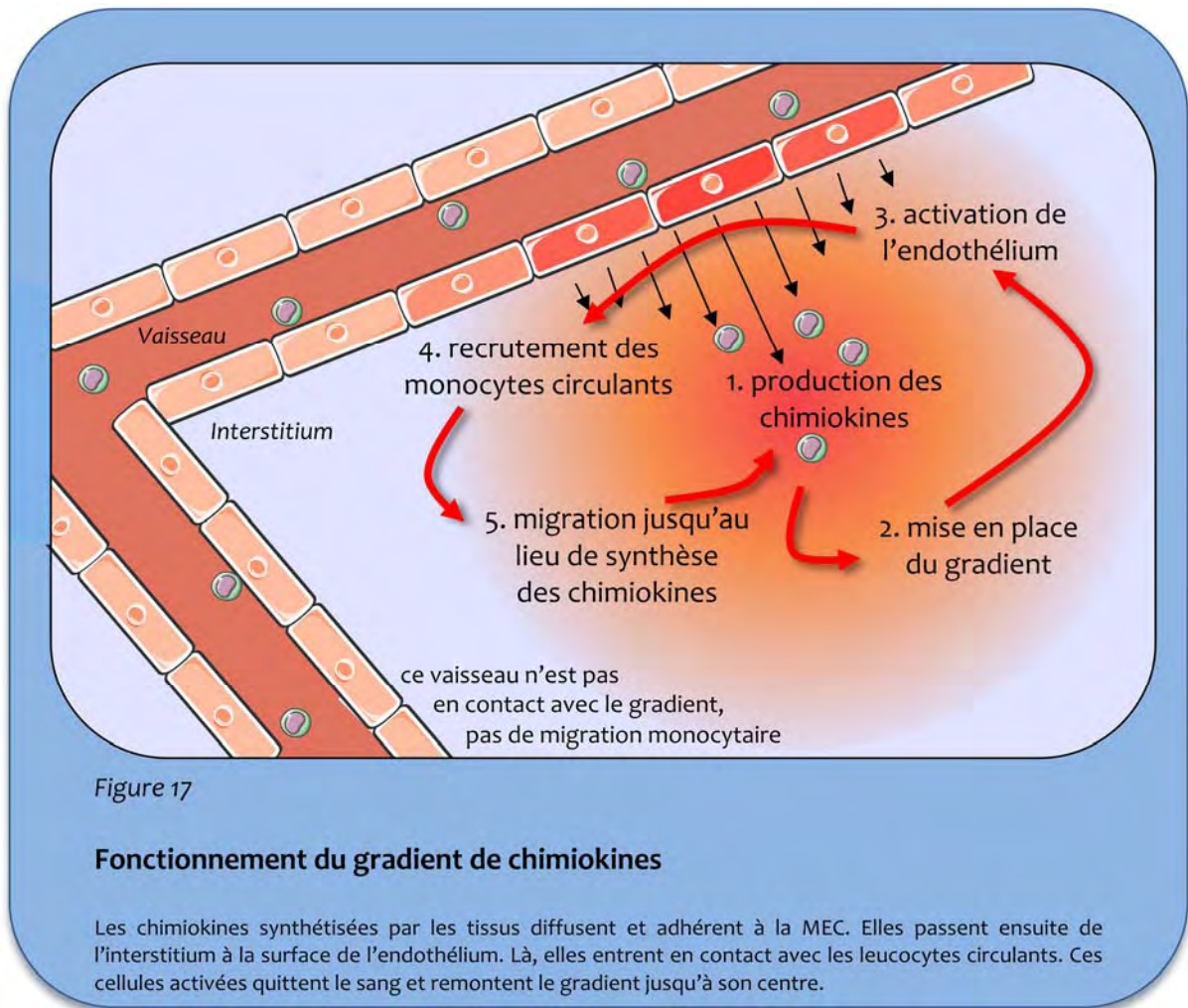
c. Rôles

Les effets des chimiokines sont très variés et concernent de très nombreux types cellulaires. Le premier est bien évidemment le pouvoir attractant de ces protéines, mais nous verrons que ces cytokines sont également en partie responsables de l'angiogénèse, la fibrose, la prolifération...

i. Chimiotactisme

Le rôle principal des chimiokines est bien évidemment le chimiotactisme. Ces protéines sont capables d'inciter le déplacement orienté de cellules. Lors de leur sécrétion, les chimiokines se dispersent dans toutes les directions et se fixent sur les protéoglycanes de la MEC et des cellules endothéliales (face apicale) (237, 238). La diversité de ces protéoglycanes est telle que la présence ou absence d'une molécule donnée peut moduler l'activité des chimiokines en permettant ou non leur adsorption. La MEC régulerait ainsi le phénomène inflammatoire. Au niveau du lieu de sécrétion des chimiokines, leur concentration sera importante et plus l'on s'éloignera de ce lieu, plus les concentrations diminueront. Pour leur passage de l'interstitium à la lumière vasculaire, un récepteur particulier des chimiokines (DARC) est impliqué dans leur transcytose (239). Dans la lumière vasculaire, les chimiokines restent adsorbées soit sur ce récepteur soit sur les protéoglycanes de surface (240, 241). Comme nous l'avons vu, dans le paragraphe sur les cellules immunitaires, les chimiokines en se fixant sur les récepteurs présents à la surface de ces cellules permettent l'augmentation de l'affinité des intégrines (VLA-4 par exemple). Ces molécules d'adhésion stoppent la course des leucocytes qui peuvent pénétrer le tissu par diapédèse. Une fois dans le tissu les cellules blanches remontent le gradient jusqu'au lieu où la concentration en chimiokines sera maximale.

Les différentes chimiokines peuvent agir sur la quasi totalité des cellules de l'organisme en conditions physiologiques ou pathologiques (232, 234, 242-248). Lors du développement embryonnaire, elles ont un rôle très important dans la migration des cellules souches. La chimiokine principalement impliquée dans le recrutement des précurseurs est CXCL12 ou SDF-1. Une autre chimiokine, CX₃CL1 ou fractalkine permet la présence de macrophages tissulaires servant de sentinelles en conditions physiologiques. Ainsi ils surveillent la présence de pathogènes et augmentent la rapidité d'intervention du système immunitaire en cas d'infection.



ii. Angiogenèse

Une classe particulière de chimiokines a des propriétés angiogéniques. En effet, les chimiokines de la famille des CXCL possédant un motif glutamate-leucine-arginine (ELR) sont de puissants facteurs inducteurs de l'angiogenèse (245, 249).

iii. Tous les autres...

Les chimiokines ne sont connues et étudiées que depuis quelques années et l'étude de leurs rôles annexes n'est que très récente. De plus, chaque chimiokine possède des spécificités de cible et d'action. Parmi tous ces effets, on peut citer les effets fibrosants de CCL2. *In vitro*, cette chimiokine augmente l'expression du collagène I de façon TGF β dépendante et indépendante (250). On peut également citer l'effet

potentialisateur de CCL3 ou MIP-1 α sur l'activité proliférative du GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) (251).

A ces observations, nous pouvons ajouter les nôtres qui montrent que le traitement de cellules épithéliales tubulaires rénales par CCL7 occasionne une augmentation de l'expression des cytokines pro-fibrosantes, TGF β et CTGF, et du collagène de type I (175).

3. ... et leurs récepteurs

L'une des particularités des chimiokines par rapport aux autres cytokines est qu'elles médient leurs effets via des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs sont exprimés de façon différentielle dans les différents types cellulaires constituant l'organisme et sont à l'origine des effets des chimiokines décrits dans le paragraphe précédent. D'un point de vue technique, ceci en fait de très bons marqueurs d'identification cellulaire. Des points de vue physiologique et physiopathologique, cette propriété assure une grande spécificité du signal.

a. Structure et classification

Ces récepteurs aux chimiokines appartiennent à la classe A des RCPG dont le prototype est la rhodopsine (237, 238). La partie N-terminale et les trois boucles extracellulaires forment le site de liaison aux chimiokines alors que la partie C-terminale et les boucles intracellulaires permettent la transduction du signal et la régulation du récepteur (237, 252). Bien que les structures primaires de ces récepteurs soient considérablement différentes, leurs structures tertiaires sont très similaires (252). Ainsi, il n'est pas surprenant que plusieurs chimiokines lient un même récepteur et qu'inversement, plusieurs récepteurs lient la même chimiokine (243-248). Pour cette raison, le système des chimiokines a longtemps été décrit comme redondant (253). Or de nombreuses études ont démontré que cibler une seule chimiokine ou un seul récepteur avait des effets sur l'inflammation et la fibrose (254-257). Les chimiokines auraient donc des spécificités d'action et l'absence d'une chimiokine ou d'un récepteur ne serait pas totalement compensée.

La classification de ces récepteurs est calquée sur les différentes classes de ligands. Ainsi les récepteurs aux chimiokines CXCL sont les CXCR. A l'heure actuelle, 10 CCR, 6 CXCR, 1 XCR et 1 CX₃CR sont connus (232), mais il reste toujours des récepteurs orphelins et il n'est pas impossible que certains récepteurs aux chimiokines s'y cachent.

Famille	Nom	Ligands	Famille	Nom	Ligands
CCR	CCR1	CCL3-5-6-7-14-15-16-23	CXCR	CXCR1	CXCL1-6-8
	CCR2	CCL2-7-12-13		CXCR2	CXCL1-2-3-5-6-7-8
	CCR3	CCL5-7-8-11-13-15-24-26-28		CXCR3	CXCL4-9-10-11
	CCR4	CCL17-22		CXCR4	CXCL12
	CCR5	CCL3-4-5		CXCR5	CXCL13
	CCR6	CCL20		CXCR6	CXCL16
	CCR7	CCL19-21			
	CCR8	CCL1	XCR	XCR1	XCL1-2
	CCR9	CCL25			
	CCR10	CCL28	CX ₃ CR	CX ₃ CR1	CX ₃ CL1

Figure 18

Nomenclature des récepteurs aux chimiokines

Classification des récepteurs aux chimiokines avec les ligands.

b. Voies de signalisation

Les récepteurs aux chimiokines sont sensibles à la toxine pertussique ce qui indique un couplage avec une protéine G inhibitrice (Gi). Ces protéines G inhibent l'adénylate cyclase (AC) et la production d'AMP cyclique (AMPc) (247). Actuellement, peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes d'activation de ces récepteurs. Les grandes voies de la phospholipase C et de la PI3K sont clairement identifiées mais les voies particulières à chaque récepteur le sont beaucoup moins.

Une capacité de ces récepteurs à dimériser est maintenant bien connue (237, 238, 247, 258, 259). Si l'on s'en réfère aux travaux réalisés sur d'autres RCPG, l'homo- ou hétérodimérisation serait un niveau de complexité et de diversification supplémentaire dans le système des chimiokines (260, 261). Premièrement, un hétérodimère aura des propriétés pharmacologiques différentes de chaque monomère pris séparément et sera donc considéré en tant qu'entité à part entière. Ceci a été montré sur les récepteurs du goût de la langue où chaque dimère perçoit un signal différent augmentant le panel de perceptions possibles des goûts (262). Ensuite, les dimères se forment au niveau du

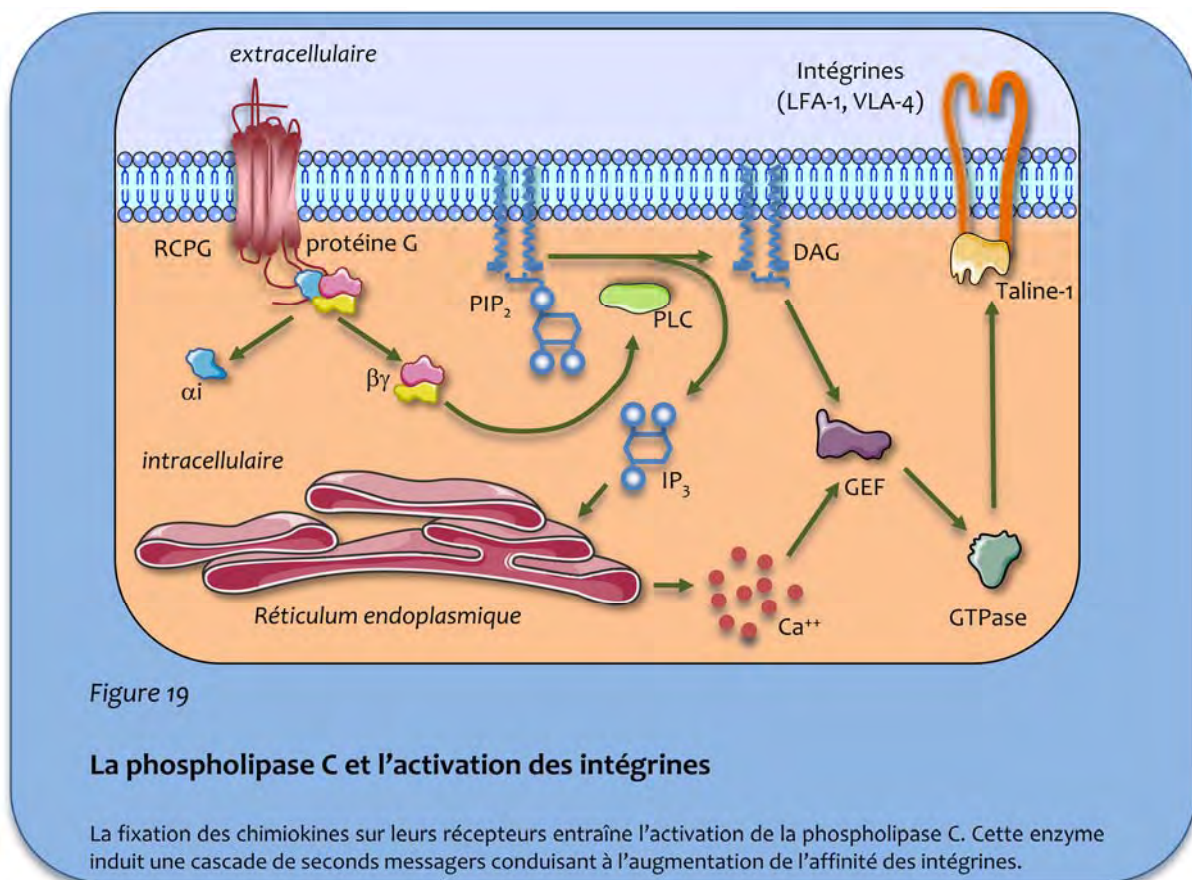
réticulum endoplasmique (RE) avant leur export à la membrane. Le processus de dimérisation régulerait la cinétique d'export à la membrane plasmique. De cette façon, le mutant de CCR5, le CCR5 Δ 32, en hétérodimérisant dans le RE inhibe l'export à la membrane de CCR5 (organisme hétérozygote) et de CXCR4, protégeant ainsi de l'infection par le VIH (263). Enfin l'hétérodimérisation pourrait permettre le découplage de la protéine G d'un des récepteurs du complexe. Ainsi, à titre d'exemple, lorsque le récepteur β 2 adrénergique dimérise avec le récepteur aux prostaglandines EP-1, il perd sa protéine G et n'est plus capable d'activer l'AC (264).

Toutes ces récentes découvertes ouvrent un champ de perspectives très large pour l'étude de la signalisation des chimiokines. Si l'on récapitule les niveaux de complexité : il existe de nombreuses chimiokines qui peuvent chacune se lier à plusieurs récepteurs capables de dimériser avec d'autres récepteurs pour former des entités pharmacologiques indépendantes... activant des voies de signalisation elles aussi potentiellement diverses. La compréhension de ces mécanismes nous promet de belles surprises et, très certainement, de nouveaux mécanismes de régulation de ce système. Sur les enzymes et voies de signalisation en aval de ces récepteurs, peu de choses sont connues. Nous verrons ci-dessous, deux de ces enzymes du métabolisme lipidique impliquées dans les effets chimiotactiques des chimiokines.

i. La phospholipase C

Le rôle principal des chimiokines est d'activer les cellules immunitaires circulantes afin qu'elles stoppent leur "rolling" à la surface de l'endothélium et puissent pénétrer le tissu. Cet arrêt est dû à des molécules d'adhésion forte exprimées par les leucocytes. Ces protéines appelées intégrines possèdent différents stades d'activation, basés sur leur affinité. Ainsi une intégrine de faible affinité n'arrêtera pas la course de la cellule alors qu'une intégrine de forte affinité en sera capable. Même si les mécanismes précis ne sont toujours pas connus, il est admis que l'activation des intégrines en réponse à la stimulation par une chimiokine passe par l'enzyme, phospholipase C (PLC) (265, 266). Durant le "rolling" et lorsque le leucocyte rencontre une chimiokine adsorbée sur une cellule endothéliale, il y a activation du récepteur à la chimiokine leucocytaire et dissociation de la protéine G. La sous-unité $\beta\gamma$ active la PLC responsable de la production

de diacyl glycérol (DAG) et du relargage du calcium contenu dans le RE. Ces deux messagers activent des facteurs d'échange du GTP qui activent à leur tour les petites GTPases telles que RhoA, Rac ou Rap1 (266). Une étude récente nous apprend que Rap1 dans une cascade de réaction permet l'activation des intégrines, LFA-1 et VLA-4 pour les principales, via la fixation de la taline-1, protéine associée au cytosquelette d'actine (267). Ainsi ces intégrines (LFA-1 et VLA-4) ont une affinité fortement augmentée pour leurs partenaires endothéliaux, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 et MADCAM-1 et permettent l'arrêt de la cellule qui pourra par la suite remanier son cytosquelette pour la diapédèse.



ii. La phosphoinositide 3-kinase

A la suite de l'activation de ces récepteurs, plusieurs voies de signalisation sont activées. Parmi elles, la famille des phosphoinositide 3-kinase (PI3K) semble jouer un rôle prépondérant. Ces enzymes permettent de catalyser la phosphorylation en position 3-OH de l'inositol des phosphoinositides. Leur activité conduit à la formation d'un second messager de premier ordre, le PI(3,4,5)P₃. De par son rôle, la concentration de ce lipide

doit être très finement régulée. Pour cela, plusieurs phosphatases sont capables de déphosphoryler les phosphoinositides. Les SH2-containing inositol phosphatases (SHIP1 et 2) et la Phosphatase and tensin homolog (PTEN) déphosphorylent le groupement inositol pour former respectivement du $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ et du $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (268-271).

Le $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ ainsi formé sert d'ancrage à des protéines possédant un pleckstrin homology domain telles que la $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ - dependent protein kinase-1 (PDK-1), la protéine kinase B (PKB/Akt) ainsi que plusieurs isoformes de la phospholipase C (PLC) ou de nombreux guanine nucleotide exchange factors (GEF) des petites protéines G de la famille Rac (268-271). Ces protéines sont impliquées dans les phénomènes de survie, prolifération, remodelage du cytosquelette ou migration.

Dans l'étude des chimiokines, les PI3Ks ont été très largement étudiées pour leur rôle sur la migration cellulaire. Il existe plusieurs isoformes de PI3Ks et il est important de connaître leurs caractéristiques avant de voir leur rôle. De par leur composition, leur mode d'activation et la spécificité pour leurs substrats, ces enzymes sont réparties en trois classes. Toutefois seule la classe I semble impliquée dans les phénomènes inflammatoires (270).

- Classe I :

Ces PI3K sont composées de deux sous-unités, une sous-unité catalytique p110 α , β , δ ou γ et d'une sous-unité régulatrice. Le substrat préférentiel de ces enzymes est le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ qui donnera du $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, mais elles sont tout de même capables de phosphoryler le PI et le $\text{PI}(4)\text{P}$ pour donner respectivement le $\text{PI}(3)\text{P}$ et le $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ (268-271). Même si leurs substrats et la composition de ces enzymes sont semblables, on distingue toutefois différents modes d'activation qui ont conduit à l'établissement de deux sous-classes.

Classe IA

Composée des trois isoformes PI3K α , β et δ , ce groupe d'enzymes est activé par des récepteurs à activité tyrosine kinase. La sous-unité régulatrice, via ses domaines SH2, se lie aux phosphotyrosines des récepteurs phosphorylés ou aux substrats phosphorylés par ces derniers (269, 270, 272).

Ces enzymes peuvent être activées de façon indirecte par les récepteurs aux chimiokines. La sous-unité $G\alpha i$ commune à la plupart de ces récepteurs peut se lier et activer la kinase Src qui phosphorylera les radicaux tyrosine de ses substrats (269). Ces phosphotyrosines seront le site de reconnaissance de la sous-unité régulatrice des PI3K de la classe IA. Cependant, bien qu'elles puissent influencer la migration, elles ne participent que de façon minime à l'accumulation de $PI(3,4,5)P_3$ (269).

L'étude de ces enzymes a montré que des souris invalidées pour les PI3K ubiquitaires α ou β n'étaient pas viables ce qui prouve le caractère non redondant et essentiel de ces enzymes (270, 273). A l'inverse, l'expression de la PI3K δ est restreinte au système hématopoïétique et son absence d'expression conduit à des souris sans phénotype particulier en conditions physiologiques, mais présentant un défaut de réponse immunitaire dans différentes pathologies. Cette isoforme joue un rôle primordial dans la différenciation et la maturation des lymphocytes T (270). L'inhibition de PI3K δ conduit à une diminution du nombre de Th1 et de Th2 et bloque la maturation des Treg. Chez les progéniteurs de lymphocytes B, le blocage de PI3K δ inhibe la maturation de pro-B à pré-B et chez des lymphocytes B matures, il diminue la production d'anticorps (270).

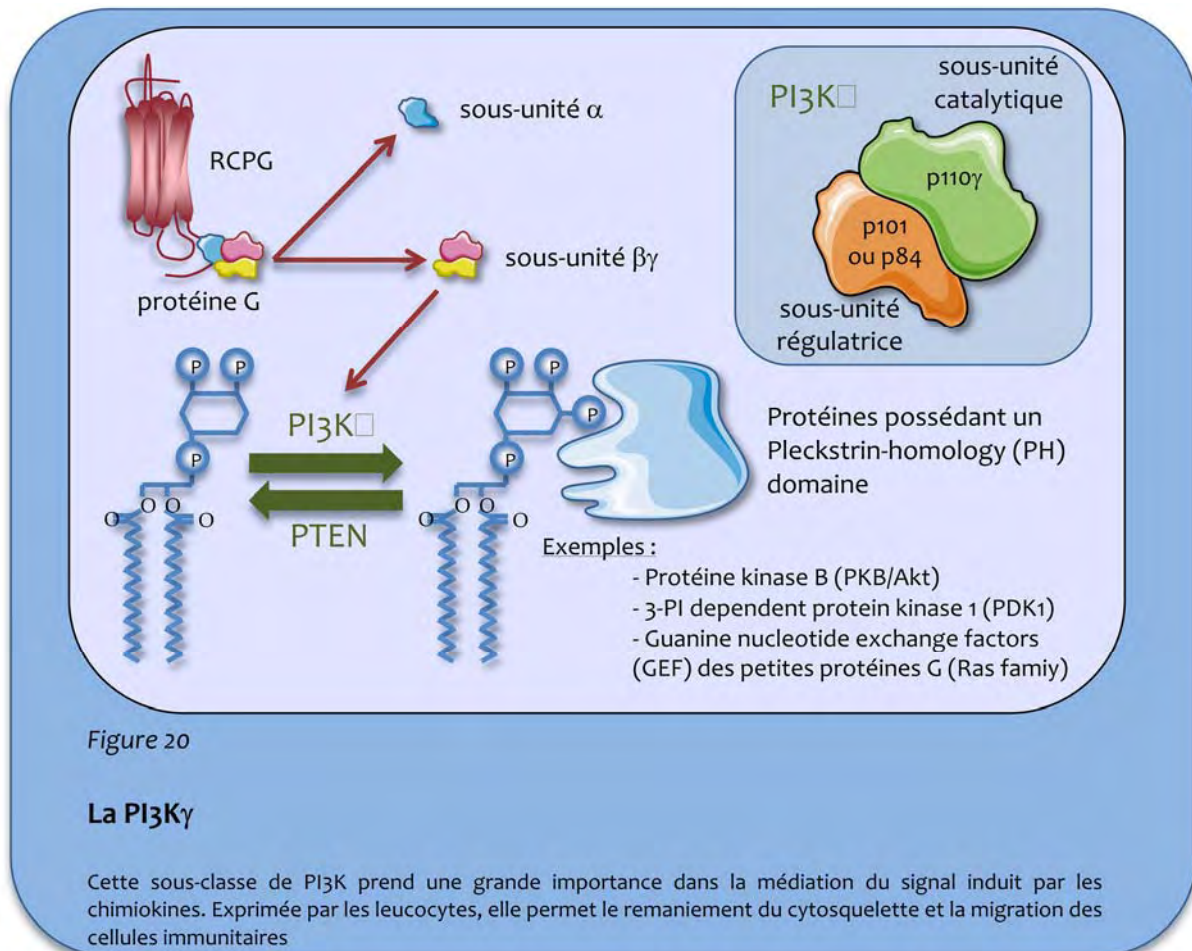
L'isoforme PI3K δ est particulièrement impliquée dans l'immunité acquise et d'ores et déjà, des inhibiteurs spécifiques sont en cours de développement (270).

Classe IB

Cette classe IB ne contient qu'une isoforme, la PI3K γ dont l'activation fait suite à la stimulation d'un RCPG. Après fixation du ligand sur son récepteur, la protéine G hétérotrimérique se dissocie et la sous-unité $\beta\gamma$ se fixe à la sous-unité régulatrice de la PI3K γ causant ainsi l'activation de la sous-unité catalytique (268-272). Il a été montré récemment que la PI3K β pouvait être activée de la même façon. La PI3K γ est majoritairement exprimée dans les leucocytes, mais on la retrouve également dans les vaisseaux, tant dans les cellules endothéliales que dans les cellules musculaires lisses (271).

Lors de la migration, la cellule se polarise avec une réorganisation du cytosquelette et de la membrane plasmique. Dans la partie frontale sont présents les récepteurs aux chimiokines ainsi que tous les "sensors" du chimiotactisme. Associée à ces

récepteurs, on retrouve la PI3K γ ainsi que de fortes concentrations en PI(3,4,5)P₃, en actine F et en PKB/Akt. Sans cette enzyme, les cellules sont toujours capables de se mouvoir mais elles le feront dans des directions aléatoires. Pour cette raison, la PI3K γ est comparée à une boussole qui fixe le cap de la migration (269, 274). Dans la partie postérieure, on retrouve les phosphatases qui métabolisent le PI(3,4,5)P₃ et permettent le maintien du gradient de PI(3,4,5)P₃ et le sens de migration (274, 275).



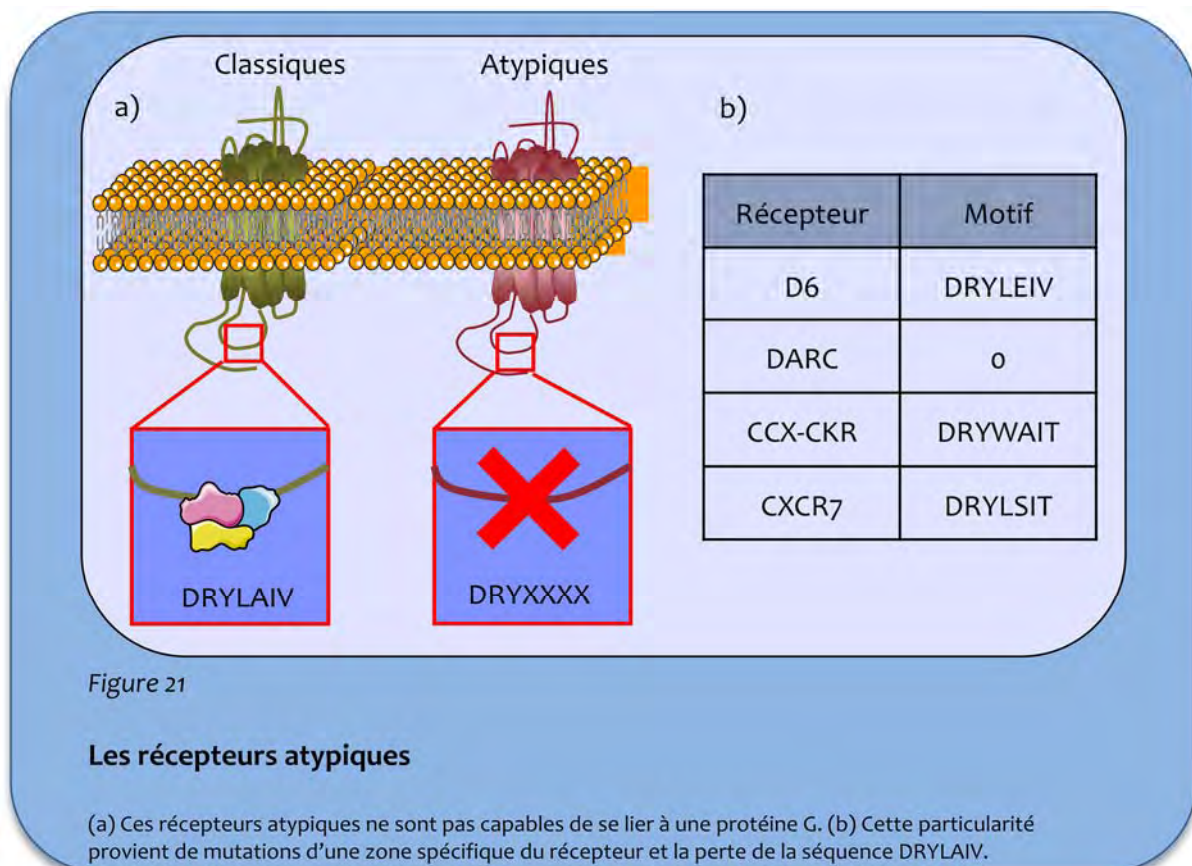
La PI3K γ est devenue en quelques années une cible de choix pour le traitement des pathologies inflammatoires. Certains auteurs spéculent même sur le potentiel thérapeutique de son inhibition : "PI3K γ inhibition: towards an "aspirin of the 21st century"?" (272). En effet, de nombreuses études dévoilent que le blocage de la PI3K γ empêche les monocytes et les neutrophiles de répondre au gradient de chimiokines (269-272). Dans l'arthrite rhumatoïde, l'absence de cette enzyme réduit l'inflammation et l'atteinte du cartilage qui en découle (273). Au niveau rénal, l'inhibition de la PI3K γ bloque la progression de la glomérulonéphrite dans un modèle de lupus érythémateux systémique et augmente la durée de vie des souris traitées (276). Enfin, la PI3K γ contrôle

les effets toxiques des neutrophiles dans les glomérulonéphrites à ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) (277).

De par sa spécificité d'expression et son implication dans la migration des cellules inflammatoires, l'inhibition de la PI3K γ pourrait être un traitement de choix pour de nombreuses pathologies inflammatoires (270). A l'heure actuelle, de nombreux inhibiteurs sont encore en phase de test (272). Au vu des études précliniques, nous ne pouvons que souhaiter à ces inhibiteurs un devenir aussi prestigieux que celui de l'aspirine en son temps.

c. Les récepteurs atypiques

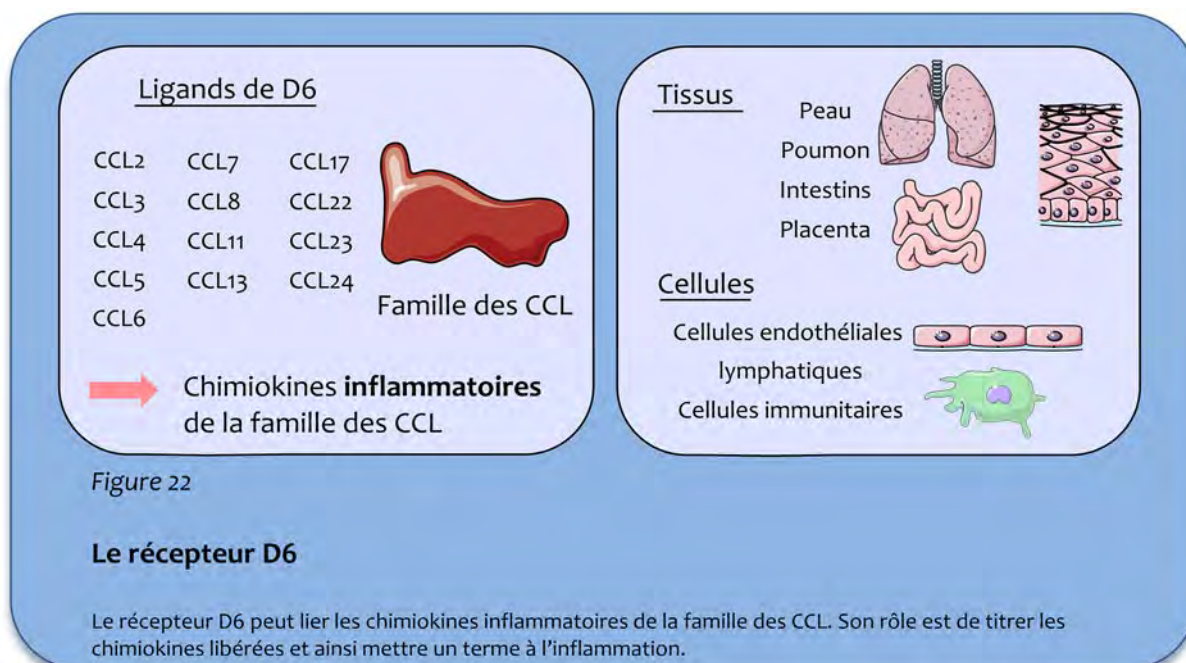
En plus des dix-huit récepteurs classiques, quatre nouveaux récepteurs atypiques ou « silencieux » ont été identifiés. Le rôle primordial de ces récepteurs, pour certains connus depuis longtemps, n'a été compris que très récemment. Ces récepteurs sont D6, DARC, CCX-CKR et CXCR7.



Ces récepteurs appartiennent également à la famille des RCPG. Toutefois, ils ont des mutations au niveau de la séquence de couplage avec la protéine G dans la seconde boucle intracellulaire, ce qui les rend incapables de transduire le signal via une protéine G. L'Union Internationale de Pharmacologie a défini un récepteur comme étant une protéine capable de lier un ligand et d'activer une voie de signalisation. Ces protéines ne peuvent que se lier à des chimiokines. Nous verrons par la suite qu'elles ont un rôle primordial dans de nombreux mécanismes physiopathologiques. Pour ces récepteurs, une nouvelle nomenclature, non adoptée à l'heure actuelle, a été avancée. Nibbs et al. ont proposé de les appeler CIPR-1, CIPR-2... pour « Chemokine Internalizing PseudoReceptor » ou « Chemokine Interceptors » (278). Dans la suite de cet exposé, par abus, ils seront toutefois appelés récepteurs.

i. D6 ou CCR10

- Description



D6 ou en nomenclature officielle CCR10 est un membre des CCR et peut donc lier des chimiokines de la famille des CCL. Il n'est donc pas surprenant qu'il possède de fortes homologies géniques avec les CCR et que son gène soit situé dans le même cluster que les autres récepteurs CCR (278). En effet, D6 est reconnu par CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL17, CCL22, CCL23 et CCL24 qui font partie de la

catégorie des chimiokines pro-inflammatoires. Pour cette raison, D6 a été comparé à une « éponge à chimiokines inflammatoires ».

Le récepteur D6 est exprimé dans les tissus de barrière tels que la peau, les poumons, les intestins et le placenta (278-280). Dans ces tissus, ce sont les cellules endothéliales lymphatiques, et non pas vasculaires, et les cellules immunitaires qui l'expriment (281).

La mutation de la séquence de fixation de la protéine G en DKYLEIV peut retrouver une activité de transduction si le résidu glutamate (E) de cette séquence est muté en alanine (A) (278). Ce résultat indique bien la proximité des récepteurs classiques et de ces récepteurs atypiques. La perte de la capacité de transduction a pu être considérée comme une perte de fonction au cours de l'évolution. Toutefois, ce motif DKYLEIV particulier est retrouvé chez de nombreuses espèces, laissant à penser qu'il aurait un rôle propre et qu'il aurait subi une pression de sélection afin de se maintenir (278).

- Mode d'action

D6 a la propriété de pouvoir être endocyté de façon constitutive. En effet, les RCPG classiques ont besoin de la fixation de leur ligand pour entraîner leur phosphorylation et par la suite, la fixation de la β -arrestine et la formation des puits de clathrine. Or, la fixation de la β -arrestine sur D6 est dépendante de la conformation du domaine acide C-terminal (282). Ce domaine est constitutivement phosphorylé et confère à la protéine sa stabilité et son mode de trafic intracellulaire (283). La fixation d'un ligand n'est donc pas nécessaire pour déclencher l'internalisation du récepteur (284, 285). Ainsi, 95 % des protéines D6 sont situées dans des vésicules intracellulaires et seulement une petite quantité sera exprimée à la membrane. Ce taux de récepteurs membranaires sera fortement augmenté lorsque la cellule sera dans un environnement riche en chimiokines (279).

D6 peut lier les chimiokines inflammatoires de la famille des CCL avec une forte affinité comparable à celle de leurs récepteurs « classiques ». Ces chimiokines ainsi fixées sur D6 sont internalisées dans des vésicules d'endocytose. Les endosomes fusionnent avec des lysosomes, et les chimiokines sont dégradées par lyse acide (284). D6 qui, lui, est insensible à la dégradation dans les lysosomes est réexpédié très rapidement à la

membrane (285). Les récepteurs classiques comme CCR5 sont également capables d'internaliser la chimiokine qu'ils fixent afin qu'elle soit dégradée. Toutefois, la cinétique de turn-over de D6 est bien plus rapide et efficace que celle de CCR5 (285).

- Rôle

Par sa capacité à internaliser et dégrader les chimiokines inflammatoires de la famille des CCL, D6 est un puissant « scavenger » de chimiokines et permet de réguler les phénomènes inflammatoires. Pour les rôles de D6, il est important de tenir compte des cellules qui l'expriment : cellules endothéliales lymphatiques ou cellules immunitaires.

Sur les cellules endothéliales lymphatiques :

Dans les tissus, le réseau de vaisseaux lymphatiques est un réseau lâche et très poreux qui permet le passage des cellules immunitaires des tissus vers les nœuds lymphatiques. De la même façon, les chimiokines synthétisées dans les tissus peuvent rejoindre les nœuds lymphatiques afin d'activer la mise en place de la réponse immunitaire acquise (280). Ceci permet aux nœuds lymphatiques de répondre à l'inflammation tissulaire en recrutant des leucocytes et d'assurer des réponses immunitaires innée et acquise optimales (278). Ce phénomène de « télécommande » doit être finement régulé afin qu'une inflammation bénigne ne se transforme pas en inflammation généralisée et incontrôlée. Ce rôle de « gardien » est exercé par D6 sur les cellules endothéliales lymphatiques qui évite le passage intempestif des chimiokines dans la circulation lymphatique (278, 280).

Sur les cellules immunitaires :

Les cellules immunitaires peuvent également exprimer le récepteur D6 à leur surface. Les cellules exprimant le plus ce récepteur ne sont pas les cellules inflammatoires classiques comme les neutrophiles ou les macrophages, mais les cellules dendritiques et les lymphocytes B (279). Quatre rôles principaux sont décrits pour le récepteur D6 de ces cellules.

Les chimiokines produites dans un tissu ont pour but de se fixer à la surface de l'endothélium vasculaire et de recruter les cellules immunitaires du sang vers

l'interstitium. D6 sur ces cellules circulantes permettrait d'éviter l'accumulation de chimiokine dans la lumière vasculaire et régulerait ainsi l'influx de leucocytes (279, 280).

Une fois dans le tissu, et après la résolution de l'atteinte initiale, les leucocytes présents lavent l'interstitium de toutes les chimiokines inflammatoires produites initialement et mettent ainsi un terme au phénomène inflammatoire (279, 280).

De plus, en réponse à une agression, les leucocytes doivent avoir une réponse adaptée qui doit endiguer l'atteinte sans porter préjudice aux cellules résidentes. Pour cela, D6 en diminuant les taux de chimiokines disponibles pour stimuler les récepteurs classiques, réduit l'activation de ces cellules (280).

Enfin, dans les cas d'infections, des cellules immunitaires spécialisées digèrent des antigènes étrangers et les expriment à leur surface afin de pouvoir induire une réponse immune adaptée et spécifique à ces antigènes. Ces cellules appelées présentatrices d'antigènes (CPA) dont les cellules dendritiques sont le principal représentant, sont recrutées sur le lieu de l'infection, puis, une fois activées, quittent le tissu infecté pour rejoindre les nœuds lymphatiques. Le recrutement dans les nœuds lymphatiques se fait grâce à la sécrétion par les nœuds de CCL21 et à l'expression par les CPA de son récepteur, CCR7 (286).

Premièrement, pour se rendre sur le lieu de l'inflammation, les CPA suivent le gradient de chimiokines inflammatoires jusqu'au lieu d'entrée des contaminants. Dans un second temps, ces cellules expriment *de novo* le CCR7 pour quitter le tissu. Toutefois, elles sont tiraillées entre l'attraction provoquée par les chimiokines inflammatoires du tissu et celle induite par CCL21 des nœuds lymphatiques. D6 dégraderait donc les chimiokines inflammatoires et permettrait ainsi aux CPA de quitter le tissu pour les nœuds lymphatiques (280).

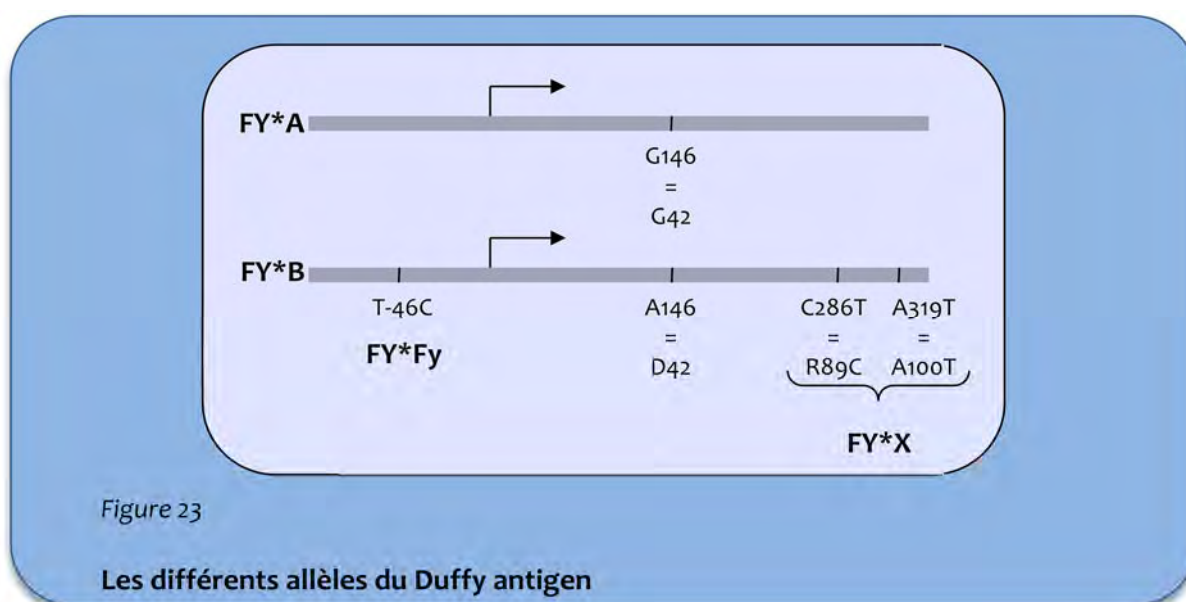
Sur le développement de tumeurs :

Enfin, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de D6 dans le développement des tumeurs. Une étude réalisée sur le développement de tumeur de la peau (287) a démontré que la délétion de D6 était suffisante pour inciter la formation spontanée de tumeurs et que dans un modèle d'induction de tumeurs, la surexpression de D6 permettait de limiter la tumorigénicité. Le contrôle de l'inflammation par D6 semble donc avoir également un rôle important à jouer dans les phénomènes cancéreux.

ii. DARC (Duffy Antigen / Receptor for Chemokines)

- Duffy Antigen...

En 1950, un nouveau groupe sanguin a été découvert (288). Le patient, M. Duffy présentait des anticorps qui agglutinaient 66 % des sangs testés à l'époque et ce, de façon indépendante de tous les autres systèmes connus (ABO, rhésus...). Avec l'accord du patient, l'antigène à l'origine de ces anticorps a été nommé « Duffy antigen ». Quelques années plus tard, des chercheurs ont mis en évidence que cet antigène était un facteur d'entrée du parasite de la malaria *Plasmodium vivax* dans les globules rouges (289). Le *Plasmodium* se fixe sur l'érythrocyte, mais sa pénétration dans la cellule est dépendante du Duffy antigen. En s'intéressant à la susceptibilité de différentes populations à l'infection par la malaria, il a été montré que la résistance au parasite des populations africaine et noire américaine était due à la non-expression de ce marqueur. Au cours de l'évolution, cette sensibilité à la pathologie aurait exercé une pression de sélection sur ces populations.

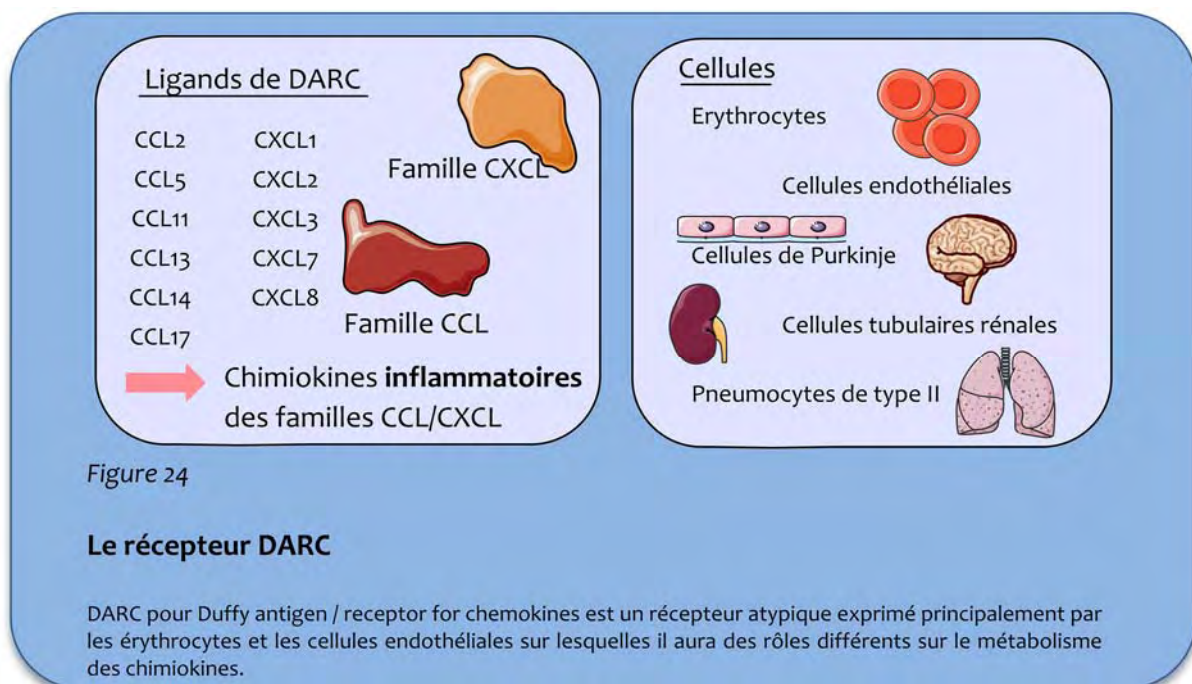


Il existe quatre allèles pour cet antigène, FY*A, FY*B, FY*X et FY*Fy (290). Les allèles FY*X et FY*Fy sont en fait des mutations de l'allèle FY*B. FY*A code pour le phénotype Fy(a+), FY*B, pour Fy(b+), FY*X, pour Fy(b^w) (w pour weak) qui est une très faible expression (moins de 5 %) de l'antigène B et FY*Fy possédant une mutation de la

séquence du promoteur de l'antigène B et empêchant la fixation du facteur de transcription érythrocytaire, GATA1 (278, 279, 290), pour Fy(a-b-).

- ... Receptor for Chemokines

Quarante ans après la découverte du Duffy Antigen, plusieurs études ont mis en évidence la fixation spécifique et de haute affinité ($K_d = 5 \text{ nM}$) de l'interleukine 8 (CXCL8), RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2) et Gro- α (CXCL1) à la surface de globules rouges (291). L'affinité de cette fixation laissait penser à un récepteur spécifique ayant pour rôle de titrer les excès de chimiokines circulantes. Ce récepteur avait la particularité unique de pouvoir lier des ligands appartenant à des familles différentes de chimiokines (CCL et CXCL). La nature de ce récepteur a été subodorée suite à plusieurs observations. Premièrement, les érythrocytes de personnes Fy(a-b-) étaient incapables de lier le CXCL8. Ensuite, le traitement de globules rouges par un anticorps monoclonal empêchait la liaison des chimiokines et enfin le traitement par des chimiokines de ces cellules les protégeait de l'infection par le parasite du paludisme, *Plasmodium knowlesi*.



A la suite du clonage du Duffy Antigen et sa surexpression dans un modèle cellulaire érythroleucémique, la fixation de chimiokines et son blocage par des anticorps dirigés contre le Duffy Antigen a été évaluée et ainsi la preuve a été fournie que le Duffy Antigen était l'entité capable de fixer les chimiokines inflammatoires des familles CCL et

CXCL (CCL2, CCL5, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17 et CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL7, CXCL8) (292).

Ce système de marqueur sanguin qui possédait des propriétés de liaison aux chimiokines a été renommé DARC pour Duffy Antigen / Receptor for Chemokines.

- Rôle

Sur les érythrocytes :

Nous ne reviendrons pas ici sur le rôle primordial de DARC dans l'infection par les parasites paludéens : *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi*. Nous nous attacherons à ses fonctions immunitaires.

L'expression de DARC sur les globules rouges peut avoir des effets opposés. Des observations ont montré que les animaux invalidés pour DARC avaient des taux de CCL2 circulants fortement réduits en comparaison de ceux obtenus chez des animaux sauvages (278, 281). Dans ce cas, DARC agirait comme un tampon en permettant le maintien de taux circulants de chimiokines. À l'inverse une autre étude décrit que seuls les érythrocytes DARC+/+ pouvaient neutraliser les chimiokines angiogéniques synthétisées par les cellules cancéreuses prostatiques (281). DARC est, dans ce cas, un leurre permettant de diminuer les chimiokines circulantes. Cette observation pose un problème de santé publique dans les populations noires qui sont à 70 % DARC-négatives et donc prédisposées à cette classe de cancers. Cet apparent paradoxe entre maintien/neutralisation peut être expliqué par les concentrations de chimiokines. À forte concentration, DARC titrerait les chimiokines alors que pour de plus faibles concentrations, il permettrait leur fixation à la surface des globules rouges et donc leur disponibilité dans le sang.

Sur les cellules endothéliales vasculaires :

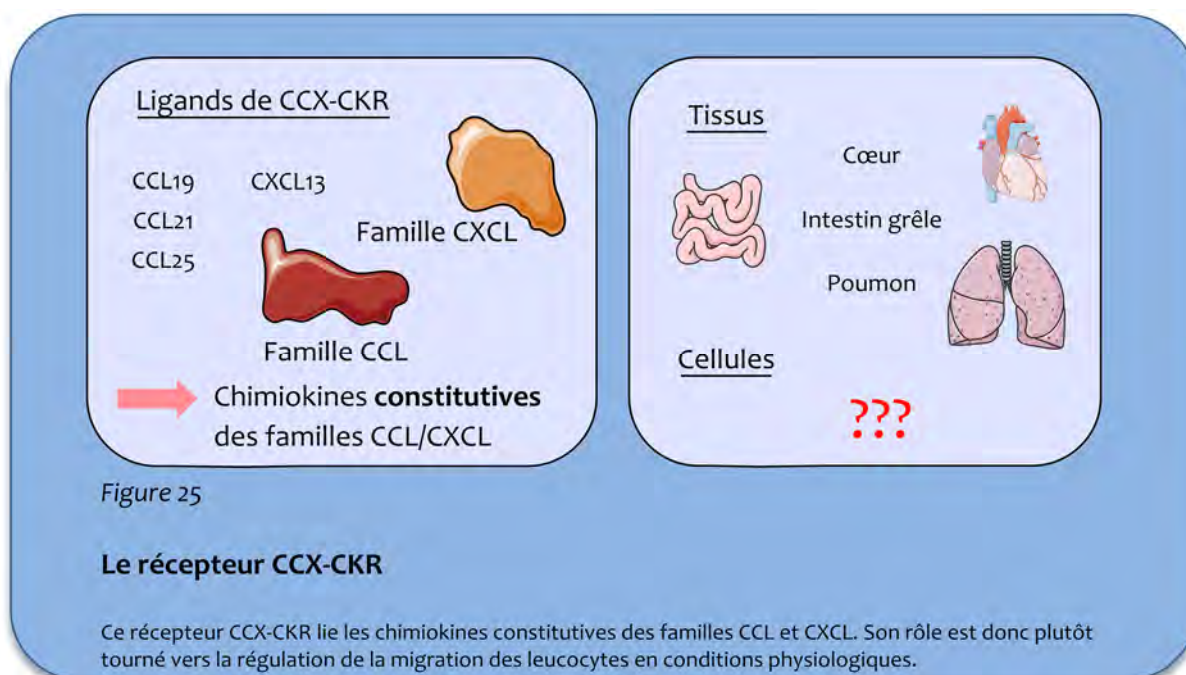
Ce récepteur atypique est également exprimé au niveau des vaisseaux sanguins par les cellules endothéliales. Des observations montrant que l'absence de DARC diminuait l'influx neutrophilaire suite à l'injection de CXCL8, ont conduit à penser qu'il pouvait avoir des actions pro-inflammatoires (278, 281). Récemment une étude sur la mécanistique d'action de DARC a permis de mieux appréhender sa fonction (239).

Sur des cellules cultivées en Transwell, les auteurs expliquent que la présence de chimiokines sur le pôle baso-latéral, entraîne une relocalisation des récepteurs du pôle basal vers le pôle apical. Ajoutée au fait que DARC est connu pour s'associer aux cavéoles, cette observation laisse penser qu'il permet la transcytose des chimiokines. Dans cette même étude, il est mis en évidence que cette transcytose est unidirectionnelle du côté baso-latéral vers l'apical et que la transcytose n'affecte en rien les chimiokines. A l'inverse de D6, DARC ne dégrade pas les chimiokines qu'il internalise. De plus, il est dit que les chimiokines se fixent au niveau de la lumière vasculaire sur les molécules de glycosaminoglycanes (GAG) présentes à la surface des cellules endothéliales et que cette interaction permet la reconnaissance par les cellules immunitaires circulantes (239, 242, 245). Bien que ce mécanisme ne soit pas remis en question, il semblerait que DARC puisse également jouer ce rôle. En effet, après transcytose et digestion enzymatique du GAG au pôle apical, les chimiokines restent fixées à la surface des cellules. Ce résultat laisse penser que le récepteur DARC pourrait présenter directement les chimiokines aux récepteurs des leucocytes. Enfin, *in vivo* des animaux surexprimant DARC, répondent plus fortement à la stimulation intra-péritonéale par CXCL1. L'influx de neutrophiles est bien plus prononcé chez ces animaux. DARC est donc un récepteur qui permet le passage des chimiokines de l'interstitium vers la lumière tubulaire et éventuellement leur présentation aux cellules immunitaires.

Cette étude permet de comprendre des observations faites au préalable. Une étude avait révélé que chez des souris surexprimant DARC, la réponse à des chimiokines angiogéniques était diminuée (293). Il a tout d'abord été proposé que DARC pouvait dégrader ces chimiokines. Or, il semble que cela ne soit pas le cas. Pour induire son effet angiogénique, la chimiokine doit se situer dans l'interstitium. En l'absence de DARC, les chimiokines ne sont pas exportées et stagnent au pôle baso-latéral des cellules endothéliales permettant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux (239). L'autre hypothèse est basée sur le fait que l'hétérodimère DARC et CCR5 est incapable de transduire un signal alors que CCR5 le peut (294). Dans le cas de l'angiogénèse, DARC pourrait former un hétérodimère avec CXCR2 (récepteur aux chimiokines ELR+ angiogéniques) qui conduirait à l'absence de signal par ce dernier et inhiberait la réponse angiogénique (239).

iii. CCX-CKR ou CCR11

CCX-CKR pour ChemoCentriX ChemoKine Receptor est également un RCPG atypique des chimiokines (281). Les connaissances à son sujet sont très partielles. Toutefois, il est couramment admis qu'il lie, chez l'Homme, les chimiokines constitutives des familles CCL et CXCL (CCL19, CCL21, CCL25 et CXCL13) (279, 281, 295, 296). Chez la souris, ce récepteur ne peut pas fixer le CXCL13 (281, 296).



Bien que les cellules exprimant ce récepteur ne soient pas identifiées à l'heure actuelle, il est connu que CCX-CKR est exprimé dans de nombreux tissus même si les taux retrouvés dans le cœur, l'intestin grêle et les poumons sont les plus importants (279, 281).

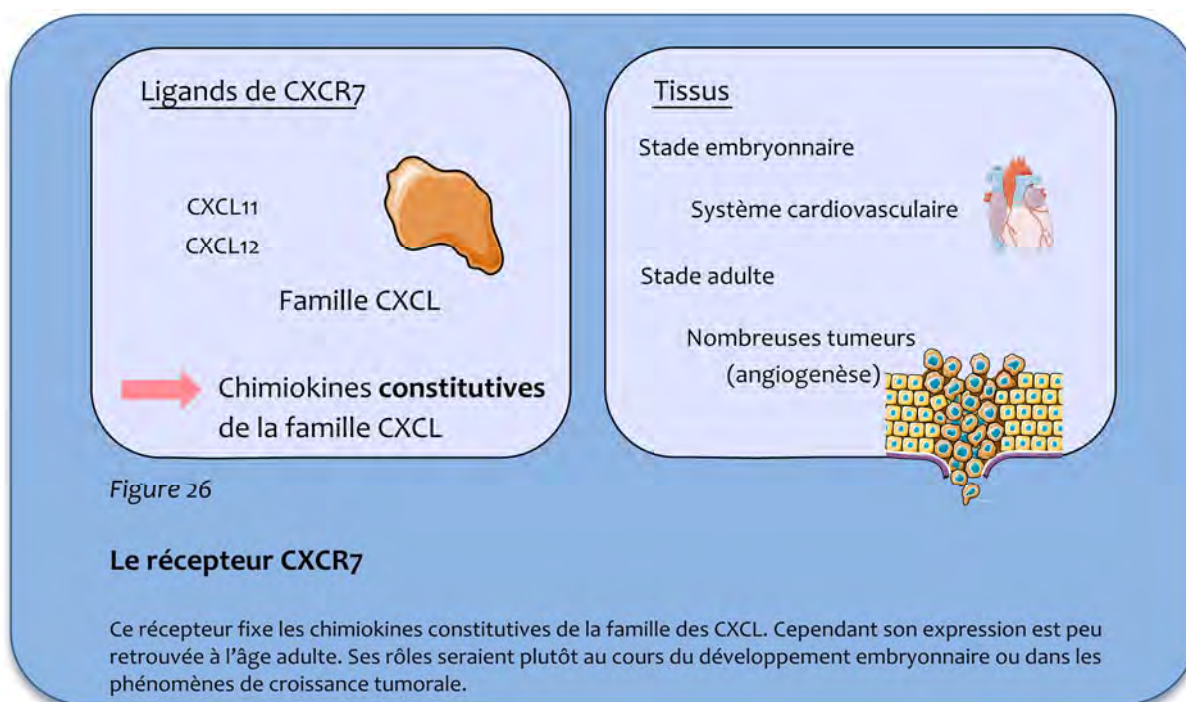
CCX-CKR présente des homologies de fonction à la fois avec D6 et à la fois avec DARC. En effet, tout comme D6, ce récepteur permet une rapide séquestration des chimiokines (ici, CCL19) et par la suite, leur dégradation (295). Cette internalisation est plus rapide et plus efficace que celle réalisée par le récepteur classique de CCL19, CCR7. De plus, au lieu d'être désensibilisé par la fixation du ligand, ce récepteur a une capacité accrue à internaliser CCL19 en présence de ce dernier. Par contre, comme pour DARC, le mécanisme de captation est indépendant de la β -arrestine mais dépendant des cavéolines (295). Il est bien admis que les cavéoles sont impliquées dans les phénomènes de transcytose. Cette propriété laisse penser qu'à l'instar de DARC, CCX-CKR pourrait permettre la transcytose des chimiokines constitutives.

CCL19 et CCL21 via leur récepteur CCR7 sont impliquées dans le recrutement des thymocytes lors de leur développement, des cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires (279, 281, 296). Des données évoquées dans deux revues mais non publiées sous forme d'article, laisseraient penser que chez des animaux invalidés pour CX-CKR, les nœuds lymphatiques présenteraient une structure anormale en conditions physiologiques comme physiopathologiques (281, 295). Toutefois, ces observations présentées en 2006 n'ont toujours pas fait l'objet d'une publication. CX-CKR aurait donc un rôle de contrôle dans la migration des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes secondaires. De la même manière que D6 permettrait la fuite des cellules dendritiques du tissu vers les nœuds lymphatiques en dégradant les chimiokines pro-inflammatoires, CX-CKR l'inhiberait en dégradant les chimiokines constitutives. La balance entre ces deux récepteurs permettra à la cellule dendritique de rester dans le tissu (prépondérance des chimiokines inflammatoires) ou de le quitter (prépondérance des chimiokines constitutives).

iv. CXCR7

CXCR7 a été identifié, il y a une vingtaine d'année, sur une banque d'ADNc de chien et appelé RDC1 pour Receptor Dog cDNA (297). Dans les années qui suivirent, son homologue humain fut découvert et classé dans les récepteurs orphelins. La découverte de ses ligands et l'absence de signalisation classique en réponse à leur fixation n'a été mise en évidence que dernièrement. C'est à cette époque qu'il a rejoint le groupe des récepteurs atypiques. Il est capable de lier les chimiokines CXCL11 et CXCL12 (279, 281). Le couple CXCL12/CXCR4 est particulièrement impliqué dans l'hématopoïèse et la migration des cellules souches dans les tissus à l'âge adulte comme au cours du développement (297). Étant le seul autre récepteur de CXCL12 et étant dix fois plus affin que son récepteur classique CXCR4, il y avait fort à parier que CXCR7 serait impliqué dans la régulation de la migration des cellules souches embryonnaires, l'hématopoïèse et les processus de cancérisation. En effet, il s'est avéré que l'inactivation de CXCR7 chez des souris était létale (279). Les animaux naissent, mais meurent très rapidement. Une étude sur le Zebrafish (298) montre que CXCR7 est exprimé au cours du développement embryonnaire quand les cellules souches commencent à migrer dans les tissus. Son

expression par les cellules somatiques est indispensable à la migration des cellules souches. Sur ces cellules somatiques, CXCR7 fixerait, internaliserait et dégraderait CXCL12 (298). Ainsi le gradient de CXCL12 serait plus fin et permettrait aux cellules souches exprimant CXCR4 d'atteindre plus précisément le lieu de synthèse de CXCL12. Ceci éviterait les anomalies de développement dues à un mauvais adressage de cellules souches (298). Tout comme D6 et CCX-CKR, CXCR7, en internalisant et dégradant les chimiokines pour lesquelles il est spécifique, permet une migration régulée et affinée des cellules.



À l'âge adulte, l'expression physiologique de CXCR7 est inexistante (279). Cependant, on le retrouve exprimé dans les cellules endothéliales lymphatiques d'un rein greffé (299). Les vaisseaux exprimant CXCR7 sont associés à des foyers inflammatoires. Il semblerait que ce récepteur soit associé au recrutement des cellules immunitaires et au rejet du greffon qui en découle (299). Son rôle précis reste toutefois à élucider. Dans d'autres conditions pathologiques, CXCR7 est réexprimé dans de nombreux cancers. Dans les cancers du sein et du poumon, l'expression de CXCR7 est corrélée à la progression de la tumeur et sa dispersion (297, 300). Ceci semble étrange lorsque l'on sait que dans ce type de cancer, les métastases sont la résultante de l'attraction de cellules cancéreuses par la chimiokine CXCL12. Si comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, CXCR7 internalise et dégrade CXCL12, la surexpression de CXCR7 devrait donc inhiber la

migration de ces cellules cancéreuses et ainsi éviter le risque de métastase. Le mécanisme ou la signalisation conduisant à ce phénomène restent à élucider. Cependant, quelques études avancent que CXCR4 et CXCR7 hétérodimériseraient et que cette association conduirait à la potentialisation du signal CXCL12/CXCR4 (297, 301). Certains agents pharmacologiques sont actuellement testés afin de bloquer CXCR4. L'antagoniste CCX754 démontre une bonne efficacité à diminuer la croissance de tumeurs humaines chez des souris (302). Ces résultats laissent penser que CXCR7 peut être une bonne cible thérapeutique dans le traitement de nombreux cancers.

v. Conclusion

Actuellement, seulement quatre récepteurs atypiques sont répertoriés chez les mammifères. Toutefois tous les récepteurs orphelins n'ont pas encore « trouvé chaussure à leur pied » et il est donc possible que dans un avenir proche, de nouveaux récepteurs atypiques se rajoutent à la liste. De plus, des résultats non publiés à l'heure actuelle ont affirmé que CXCR7 pouvait activer certaines protéines de la famille Gi. Ces résultats et les études de dimérisation des récepteurs (301) remettent en cause le dogme selon lequel ces récepteurs sont incapables de transduire un signal.

Si l'on fait la somme des pathologies dues à un défaut de développement, à une prolifération incontrôlée, à un phénomène inflammatoire persistant et à une migration cellulaire défailante, l'implication de ces récepteurs en pathologie humaine risque d'être de premier ordre dans les années à venir.

d. Les récepteurs viraux

Nous avons vu que les récepteurs aux chimiokines étaient responsables d'un large éventail d'effets cellulaires : migration, prolifération, activation, différenciation... Maîtriser tous ces événements donnerait un grand avantage aux pathogènes. Certains virus tel que le CytoMégaloVirus (CMV) reprennent à leur compte certaines chimiokines et certains de leurs récepteurs (303). Ces gènes jouent un rôle primordial dans la pathogénicité des virus. A l'inverse des récepteurs atypiques décrits ci-dessus, les récepteurs viraux sont constitutivement actifs. Pour la plupart, leur localisation cellulaire

n'est même pas sur la membrane plasmique, mais plutôt sur les membranes intracellulaires. Pour le virus, ces récepteurs représentent un avantage considérable. Ils permettent aux cellules infectées de se mouvoir dans l'organisme et aux virions de se disséminer (303). L'étude des récepteurs aux chimiokines et la recherche d'antagonistes spécifiques, en plus de leur utilité dans des pathologies inflammatoires, auraient également une application dans le traitement de certaines infections virales.

4. Implication des chimiokines en pathologie

Au cours de la présentation des chimiokines et de leurs récepteurs, nous avons déjà évoqué leur implication dans de nombreuses pathologies. En premier, viennent toutes les pathologies ayant une composante inflammatoire ou immunologique, mais nous avons vu que certains organismes pathogènes utilisaient des récepteurs aux chimiokines comme voie d'entrée dans la cellule. Parmi ceux-là, notons le parasite *Plasmodium vivax* qui infecte les érythrocytes via le récepteur atypique DARC (cf chapitre sur les récepteurs atypiques) ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui infecte les lymphocytes T et les macrophages via les récepteurs CXCR4 et CCR5. Aujourd'hui, la recherche du terme "chemokine" dans pubmed recense plus de 52 000 occurrences !!! Dans ce chapitre, nous nous en tiendrons à l'implication des chimiokines dans l'infection par le VIH et dans les pathologies rénales.

a. Chimiokines et VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus à l'origine du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le tropisme de ce virus est orienté vers les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages et sa propagation conduit à la paralysie du système immunitaire. Pour infecter une cellule, il requiert la présence sur la cellule cible d'un récepteur principal, le CD4 et d'un corécepteur, CCR5 ou CXCR4 (304, 305). Sur le versant capsulaire, les virus expriment deux glycoprotéines, la gp120 et la gp41. La gp120 se fixe sur le CD4, entraînant une modification de sa conformation. Dans cette configuration, la gp120 peut se lier au corécepteur et stabiliser le complexe et l'adhésion du virus à la surface de la cellule. La gp41 entre en jeu et "se plante" dans la membrane

plasmique cellulaire. Un pore se forme et le matériel génétique viral infecte la cellule. L'affinité des virus pour les corécepteurs est à l'origine de leur classification. Les virus R5 seront CCR5-dépendants, les X4, CXCR4-dépendants et les R5X4, CCR5 et CXCR4-dépendants.

L'infection est conditionnée par la stabilisation du complexe par le récepteur aux chimiokines. Ces deux récepteurs ont très tôt été la cible de nombreuses recherches antivirales, avec pour "effet secondaire", une meilleure compréhension moléculaire des récepteurs aux chimiokines. Nous avons déjà vu que le mutant CCR5 Δ 32 empêchait la pénétration du virus dans les cellules (263) en bloquant l'export à la membrane de CCR5 et CXCR4. Cette mutation est retrouvée dans 4 à 15 % de la population caucasienne (304). Dans cette pathologie, les chimiokines, ligands naturels et endogènes, de ces corécepteurs inhibent la progression de l'infection. Pour ces raisons, elles sont rapidement devenues une cible thérapeutique de choix. Cependant, les agonistes bloquent l'infection mais activent les cellules immunitaires. Parmi toutes les chimiokines, il se trouve que la chimiokine à laquelle je me suis intéressé, CCL7 était un antagoniste naturel de CCR5 (306). Le peu d'informations que nous avons sur cette chimiokine proviennent en grande majorité de l'étude du VIH.

A l'heure actuelle, l'industrie pharmaceutique développe de nombreuses molécules de forte affinité pour ces récepteurs (305). Pourquoi autant d'intérêt pour ces corécepteurs ? Tout simplement parce qu'ils ne sont pas soumis à des mécanismes d'échappement. En effet, les gènes viraux ont un pouvoir de mutation très important qui leur permet de devenir très rapidement résistants aux thérapeutiques. Les corécepteurs étant codés par la cellule avant son infection sont beaucoup plus stables. Dans ce but, plusieurs mutants de CCL5/RANTES sont à l'étude y compris chez l'Homme et montrent des effets bénéfiques sur la propagation du virus.

b. Chimiokines et pathologies rénales

La plupart des pathologies rénales décrites dans le premier chapitre de cette thèse ont une composante inflammatoire importante dont nous avons évoqué les conséquences sur la fibrose tubulointerstitielle dans le second chapitre. Des chimiokines comme CXCL12/SDF1 ont des effets protecteurs dans l'ischémie/reperfusion rénale (307)

alors que le récepteur à CX₃CL1/fraktalkine est délétère dans ce même modèle (308). Toutefois, l'inflammation rénale est majoritairement macrophagique. La famille des CCL synthétisées par toutes les cellules rénales (309, 310) a un tropisme important pour les macrophages. La famille des CCL était donc une cible toute trouvée pour lutter contre l'inflammation menant à la FTI. Ainsi le chef de file de ces chimiokines, CCL2/MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), et CCL5/RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted) ont été étudiées dans des modèles de néphropathies. En parallèle, l'implication de leurs récepteurs ont été évalués.

i. CCL2 et son récepteur CCR2

CCL2 (MCP-1) est la chimiokine, avec CXCL8, la plus étudiée dans les différents mécanismes physiopathologiques. Le rein n'échappe pas à la règle et l'implication ainsi que les effets de son blocage sont largement décrits dans la littérature.

Par la vaccination (311), l'utilisation d'animaux invalidés (254), de vecteurs codant pour un variant dominant négatif (257), d'anticorps neutralisants (312, 313) ou de "spiegelmers" (séquences nucléotidiques stables, spécifiques d'une protéine donnée et non immunogènes) de CCL2 (314), de nombreuses équipes ont établi les effets de CCL2 dans différents modèles de fibrose rénale. Dans la néphropathie diabétique occasionnée par la streptozotocine, le blocage de CCL2 diminue l'inflammation et améliore la fonction rénale (254). Dans le modèle de glomérulonéphrite (GN) par anticorps anti-Thy1.1, le blocage diminue l'expression du TGF β et du collagène de type IV (313). De même dans le modèle de GN provoquée par sérum néphrotoxique, l'absence de CCL2 bloque le recrutement de lymphocytes, la progression de la fibrose et restaure la fonction rénale (312). Ceci est précisé par une autre étude qui révèle que CCL2 est impliquée dans les atteintes tubulointerstitielles mais pas glomérulaires (315). Enfin dans le modèle d'OUU que nous avons utilisé dans nos études, l'inhibition de CCL2 réduit toutes les étapes du développement de la FTI, de l'inflammation à l'accumulation de MEC (257).

CCL2 a pour seul récepteur CCR2 qui, lui, par contre, peut lier CCL2, 7, 12, 13. L'antagonisme de CCR2 reviendrait donc à l'inhibition totale de CCL2 et CCL12 qui n'ont que CCR2 comme récepteur et à l'inhibition partielle de CCL7 et CCL13 qui ont d'autres récepteurs que CCR2. Ainsi, dans le modèle d'ischémie/reperfusion, les animaux invalidés

pour CCR2, présentent une inflammation fortement réduite en comparaison des animaux sauvages (316, 317). Enfin, de façon plus intéressante, un antagoniste de CCR2 administré quotidiennement à partir du quatrième jour après obstruction urétérale conduit à une diminution d'un tiers de la fibrose à quatorze jours (255).

Les protocoles expérimentaux et les mesures réalisées étant différentes, il est difficile de comparer l'efficacité du blocage de CCL2 ou de CCR2. Les deux approches font ressortir des résultats bénéfiques et valident le fait que les chimiokines peuvent être des cibles thérapeutiques dont le blocage conduit à une amélioration de la pathologie fibrosante.

ii. CCL5 et ses récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5

CCL5 est, avec CCL7, la chimiokine qui peut activer le plus de récepteurs en se liant aux CCR1, 3 et 5. Leur implication dans les pathologies rénales n'est plus à démontrer. CCL5 est exprimée dans les néphrites, les obstructions rénales, les glomérulonéphrites, le lupus érythémateux, les néphropathies à IgA, la néphropathie diabétique, la glomérulosclérose, le rejet de greffe et le carcinome rénal (318). Peu d'études se sont intéressées au blocage direct de CCL5. Toutefois, il semble que l'administration d'anticorps anti-CCL5 réduise l'infiltration de macrophages et les dépôts de fibrine dans un modèle de syndrome hémolytique et urémique (319) et les lésions tubulaires induites par l'adriamycine (311).

A l'inverse, de nombreux travaux ont évalué les effets de l'antagonisme de ses différents récepteurs. Des variants de CCL5 capables d'antagoniser les trois récepteurs ont mis en lumière des effets protecteurs sur l'apparition des lésions rénales dans la néphropathie d'allogreffe (256) ou dans la glomérulonéphrite induite par sérum néphrotoxique (312). De façon plus spécifique, le rôle de chacun des récepteurs a été évalué.

Un antagoniste de CCR1, BX471, est couramment utilisé et a été testé dans plusieurs modèles de néphropathies (320). Cette molécule diminue fortement la FTI chez des souris obstruées (321) alors que dans un modèle d'ischémie/reperfusion, elle réduit légèrement l'inflammation, mais reste sans effet sur l'accumulation de MEC (322). Dans le modèle de néphropathie induite par l'adriamycine, le BX471 inhibe de moitié le

recrutement de macrophages et l'apparition des myofibroblastes, mais n'a qu'un effet modéré sur la FTI (323). Enfin au-delà de la réduction des lésions tissulaires, cet antagoniste augmente l'espérance de vie des animaux présentant un syndrome d'Alport (324). Des résultats similaires sont obtenus dans les néphropathies diabétiques, à dépôt d'IgA, et d'allogreffe (320).

Récemment, un antagoniste de CCR3 vient d'être identifié et testé sur le développement de la fibrose pulmonaire. Les résultats montrent une réduction de l'infiltrat de polynucléaires éosinophiles et de la fibrose (325). Cette molécule n'a pas encore été testée sur la fibrose rénale...

Alors que, comme nous l'avons déjà évoqué, CCR5 est très étudié dans l'infection par le VIH, son étude dans les pathologies rénales est extrêmement limitée. Un travail décrit cependant un rôle protecteur de CCR5 dans la glomérulonéphrite induite par sérum néphrotoxique (326). En effet, les animaux invalidés pour le CCR5 ont une espérance de vie diminuée due à une inflammation et une fibrose plus importantes.

Encore une fois, toutes les données présentées ici laissent penser que le blocage d'un des acteurs du système des chimiokines peut avoir des effets bénéfiques. Par contre, comme nous le montre la dernière référence, tout n'est pas à jeter dans le système des chimiokines et certains récepteurs ou même chimiokines peuvent avoir des effets protecteurs dans les pathologies rénales.

5. CCL7, MCP-3, FIC, MARC... que le dernier ferme la porte !

Pour terminer cette introduction, nous allons évoquer les informations que nous détenons à l'heure actuelle sur la chimiokine CCL7. Voilà maintenant 17 ans qu'elle a été identifiée. Dans les premières années, beaucoup d'études se sont intéressées à son métabolisme. Sont venus ensuite des travaux décrivant sa localisation dans les différents organes en conditions physiologiques ou pathologiques. Les souris invalidées pour cette chimiokine permettent maintenant de caractériser l'implication réelle de CCL7 dans les différents processus physiopathologiques. Ces animaux sur lesquels nous avons travaillé, n'ont été générés que depuis trois ans. Ils devraient fournir de nouvelles informations dans les années à venir.

a. Découverte de CCL7

CCL7 a porté plusieurs noms, au cours du temps, basés sur ses fonctions et des espèces dans lesquelles elle était décrite. Ainsi CCL7 (CC family ligand 7) = MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-3) = FIC (fibroblast-inducible cytokine) = MARC (mast cell activation-related chemokine) (327). Les noms MARC et FIC sont devenus totalement désuets, mais alors que la nomenclature actuelle est CCL7, beaucoup de publications utilisent encore l'ancien nom, MCP-3.

La découverte de CCL7 a été faite en 1992, en même temps que sa consœur CCL8/MCP-2 (328). A partir de milieux conditionnés de cellules d'ostéosarcome humain, les auteurs ont purifié les différentes cytokines et les ont séquencées. La comparaison des séquences montrait une forte homologie avec la chimiokine CCL2. Ces chimiokines se sont appelées MCP-2 et MCP-3 pour leurs effets chimiotactiques sur des monocytes et non pas sur des neutrophiles. Quelques mois après, chez la souris, l'étude d'une banque de cDNA de fibroblastes murins (329) a permis de caractériser une cytokine du type CC qu'ils ont appelé FIC et qui présentait une homologie de 57 % avec les CCL2 humain et de lapin (330). Toujours en parallèle, à partir d'une banque de cDNA de mastocytes, MARC a été identifié (331). Ce n'est que l'année suivante, en cherchant le MCP-3 murin, que des auteurs ont fait le lien entre MARC, FIC et MCP-3 et vu que ces trois entités n'en formaient qu'une.

CCL7 est synthétisée sous forme d'un précurseur de 99 acides aminés. Cette pro-forme est ensuite clivée en protéine mature de 76 acides aminés. La masse molaire théorique de cette chimiokine est de 8,96 kDa, mais elle possède plusieurs sites de N- et O-glycosylations donnant des poids moléculaires de 11, 13, 17 et 18 kDa.

Par la suite, sa structure a été déterminée par résonance magnétique nucléaire et comparée aux structures d'autres chimiokines (332, 333). Ces résultats affichent une grande homologie de structure entre les différentes chimiokines même si elles appartiennent à des familles différentes.

Petit à petit, les récepteurs de CCL7 ont été identifiés. Premièrement, par homologie avec les récepteurs connus de CCL2 et CCL5, CCR1 et CCR2 ont été décrits comme récepteurs de CCL7 (334). Ensuite, l'étude du récepteur de CCL11/Eotaxine fait apparaître que CCL7 pouvait également induire une réponse cellulaire via ce dernier (335).

Ce récepteur sans nom à l'époque s'est ensuite appelé CCR3. Enfin, CCL7 peut se fixer sur le CCR5 sans déclencher de signal (306) faisant de lui un antagoniste naturel de ce récepteur (Cf VIH).

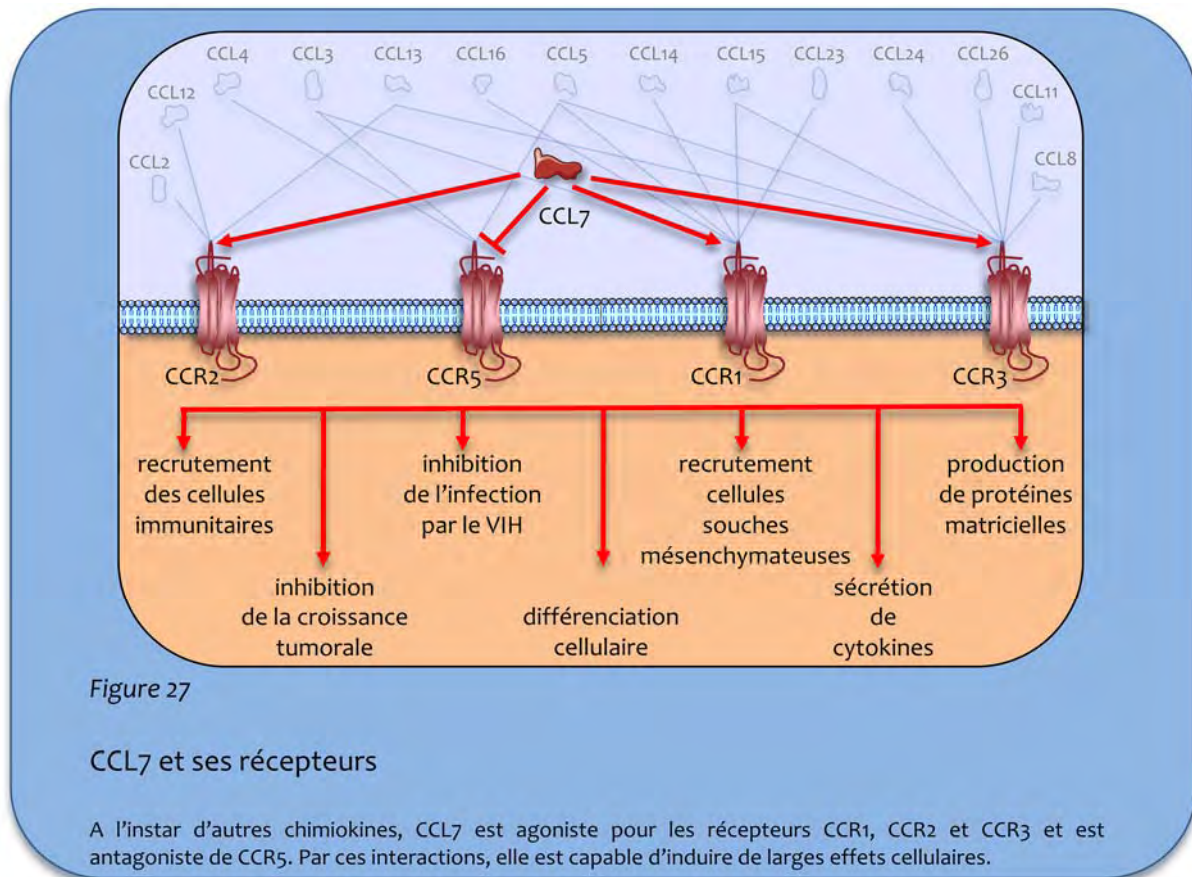
CCL7 est, comme les autres chimiokines, potentiellement exprimée par toutes les cellules de l'organisme (327, 336, 337). Les facteurs capables d'activer l'expression de CCL7 sont nombreux. L'IL1 β , le TGF β , le LPS, l'IFN γ et le TNF α favorisent fortement son expression par des cellules musculaires lisses en culture (338). Sur des monocytes, les interférons (IFN α , IFN β et IFN γ) augmentent également la sécrétion de CCL7 (339) et sur des astrocytes, ce sont le TNF α et l'IL1 β qui l'induisent (340). Ces résultats sont fournis à titre d'exemple et ne forment pas une liste complète des inducteurs de CCL7.

b. Rôles connus de CCL7

Comme les autres chimiokines, CCL7 a des effets très variés et peut se révéler bénéfique ou délétère en fonction des différentes conditions physiopathologiques. Nous allons répertorier ici les principaux effets connus de CCL7. J'insiste sur le mot "connus" car comme je l'ai déjà évoqué la communauté scientifique ne s'intéresse aux effets "annexes" ou non inflammatoires des chimiokines seulement depuis quelques années.

i. Inflammation

En tant que chimiokine, CCL7 est un puissant facteur chimioattractant. Elle a un tropisme particulier pour les monocytes (328) mais peut également recruter des basophiles et des éosinophiles (341). Dans l'inflammation allergique bronchique, le blocage de CCL7 par des anticorps réduit de plus de 80 % l'influx d'éosinophiles (342). CCL7 permet également l'influx des lymphocytes et des neutrophiles (327, 343). L'équipe de Charo qui nous a fourni les animaux invalidés pour CCL7 a prouvé dans un très joli travail, que CCL7 était parmi les autres chimiokines de la famille des MCP (CCL2, CCL7, CCL12) la chimiokine la plus importante dans le recrutement des monocytes de la moelle osseuse vers le sang (344). A l'inverse, CCL2 serait plus puissante pour permettre le passage des monocytes du sang vers les tissus.



ii. Recrutement de cellules souches

En plus de ses effets sur le recrutement de cellules immunitaires, CCL7 est capable d'activer l'influx de cellules souches mésenchymateuses dans le cœur infarcté (345). Dans ce tissu présentant des lésions nécrotiques, les cellules souches recrutées ne se différencient pas en cardiomyocytes mais en myofibroblastes qui permettent, à défaut de récupérer un potentiel contractile, de maintenir l'intégrité du tissu.

iii. Induction de la production de cytokines

Dans les mécanismes inflammatoires, CCL7 a également des effets sur la production et la sécrétion de différentes cytokines. En effet, la production de l'IL4 impliquée dans l'activation des lymphocytes B est régulée en partie par CCL7 (346). Dans ce processus, c'est le CCR2 qui est responsable de l'inhibition de la production d'IL4. Lors du blocage seul de CCL2 ou de CCL7, la production d'IL4 est toujours réprimée alors que lorsque les deux sont bloquées, la sécrétion d'IL4 augmente. Par ailleurs, ces résultats

illustrent le mécanisme de redondance du système des chimiokines puisque en l'absence d'une chimiokine l'autre est capable de compenser ses effets.

iv. Effets fibrosants

Dans les processus fibrosants, CCL7 est capable d'activer la transcription du collagène de type I dans des fibroblastes dermiques humains (347). Cet effet est, en partie, réversé par l'ajout d'anticorps neutralisants du TGF β laissant penser à des effets TGF β dépendants et indépendants. De surcroît, le TGF β active la sécrétion de CCL7 qui potentialise les effets de la cytokine (348). Il s'établit ainsi un cercle vicieux où la cytokine induit la chimiokine qui potentialise la cytokine et augmente sa synthèse et ainsi de suite... Ces résultats sont à l'origine de notre projet visant à étudier les effets de CCL7 dans le développement de la FTI. En effet, CCL7 possède des effets pro-inflammatoires et pro-fibrosants qui sont délétères dans les processus fibrosants.

v. Effets anti-VIH

Dans la recherche pour le VIH, CCL7 inhibe la réplication du virus en bloquant la fixation du virus sur son co-récepteur CCR5 (349). Ceci pourrait expliquer, tout au moins en partie, l'effet bénéfique des phosphonates nucléosidiques acycliques. En effet, cette classe de molécule est utilisée pour bloquer la réplication de l'ADN des rétrovirus et une étude a présenté qu'en parallèle, ces agents thérapeutiques augmentaient l'expression de CCL7 (350) bloquant ainsi à la fois les étapes de réplication et d'infection du virus.

vi. Effets anti-cancéreux

De façon tout à fait spectaculaire, l'expression de CCL7 par des cellules tumorales conduit à leur rejet par 80 % des animaux infectés (351). Pour les souris qui développent tout de même une tumeur, celle-ci a une taille trois fois moins importante lorsque les cellules tumorales expriment CCL7. Cet effet est très certainement dû à l'augmentation du nombre de macrophages, de cellules dendritiques et de cellules NK recrutés dans la tumeur (352). Enfin en plus de permettre la mise en place d'une réponse immunitaire anti-

tumorale, la surexpression de CCL7 a pour dernier effet bénéfique d'empêcher la fuite de cellules de la tumeur et la formation de métastases (353). Ces résultats sont les premiers, à ma connaissance, exposant un effet bénéfique de CCL7 en pathologie, et rappellent bien qu'en physiopathologie, rien n'est tout blanc ou tout noir.

vii. Différenciation cellulaire

Enfin, avec CCL2, CCL7 est un facteur de différenciation pour les précurseurs des neurones dopaminergiques dans le cerveau mais également un facteur de croissance axonale (354). Alors que CXCL12 est impliquée dans la guidance axonale, CCL7 active la croissance axonale. Ceci est un exemple de collaboration des chimiokines dans des effets non immunitaires sur le développement du système nerveux.

viii. Et chez l'Homme ???

Chez l'Homme, il est difficile d'étudier l'implication d'une molécule pour laquelle on ne dispose d'aucun antagoniste ou bloqueur. Toutefois, de nombreuses études ont essayé de corréler l'expression de cette chimiokine avec des manifestations physiopathologiques. Dans le poumon, CCL7 est surexprimée dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de protéinose alvéolaire pulmonaire (355) et dans l'interstitium bronchique de patients présentant une pneumonie interstitielle idiopathique (356). Une étude s'est demandée si les SNP (single nucleotide polymorphism) de CCL7 pouvaient être corrélés aux différentes présentations de l'asthme mais il semble que les deux événements soient indépendants (357). Enfin dans les pathologies du côlon, CCL7 est largement surexprimée et sa localisation est corrélée avec les zones de forte inflammation (358). Dernièrement, CCL7 a été identifiée dans des biopsies de parodontites et son expression est corrélée à la potentialité d'évolution de la pathologie (359). Toutes ces études très descriptives illustrent la présence de CCL7 dans de nombreuses pathologies inflammatoires. Sur cette base-là, il serait intéressant de disposer d'un agent de blocage de CCL7 ayant potentiellement des effets bénéfiques sur ces pathologies.

c. Potentiel thérapeutique

Toutes les études présentées précédemment laissent raisonnablement penser que le blocage de CCL7 pourrait avoir des effets bénéfiques dans les pathologies inflammatoires.

i. Antagoniste

CCL7 est insensible à la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV)/CD26 qui est responsable de l'inactivation de nombreuses chimiokines (327). Par contre, CCL7 peut être métabolisée par des MMPs. La première à avoir été décrite est la gélatinase A/MMP-2. Cette protéase clive les quatre premiers acides aminés de CCL7 créant une forme tronquée 5-76 CCL7 (360). Cette réaction qui se déroule aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* conduit à la formation d'un antagoniste naturel des récepteurs CCR1, CCR2 et CCR3. On sait aujourd'hui que MMP-1, MMP-3, MMP-12, MMP-13 sont également capables de cliver CCL7 alors que MMP-7, MMP-8 et MMP-9 ne le sont pas (361, 362). L'injection de ces formes tronquées dans un modèle d'inflammation de la patte de rat, permet de réduire l'inflammation de 66 %.

Ce mécanisme de clivage et de génération d'antagoniste peut être un moyen physiologique de réguler l'inflammation et ces études nous apprennent que les formes tronquées injectées ont un effet anti-inflammatoire majeur.

ii. Mutant

L'adhésion des chimiokines aux molécules de la MEC est un mécanisme indispensable à la mise en place du gradient de concentration et donc à leurs effets chimioattractants. La modification de trois acides aminés basiques situés en positions 44, 46 et 49 de la chaîne peptidique par des alanines anéantit la capacité de CCL7 à se lier à la MEC (363). De cette façon, CCL7 perd ses effets attractants, mais conserve sa potentialité d'agoniste pour ses récepteurs. Ce mutant, lorsqu'il est ajouté à des chimiokines natives ou à des fluides synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, bloque totalement le chimiotactisme normalement induit. Cet effet s'expliquerait par une désensibilisation

des récepteurs présents sur les cellules immunitaires dans le sang, qui ne pourraient donc plus reconnaître les chimiokines adsorbées à la surface des cellules endothéliales. Récemment, une étude expose que chez des souris ayant reçu une greffe de peau, l'injection intraveineuse de ce mutant retarde le processus de rejet et augmente l'espérance de vie de ces animaux (364). Comme nous l'avons vu, les chimiokines en activant leurs récepteurs mènent à l'augmentation d'affinité des intégrines (VLA-4, LFA-1) leucocytaires. Ces intégrines de forte affinité peuvent ensuite lier leurs partenaires endothéliaux (ICAM, VCAM). Ce mutant de CCL7 bloque l'activation des intégrines et par ce biais, diminue l'inflammation.

Ces quelques études servent de preuve de concept et laissent penser que CCL7, de par toutes les caractéristiques présentées dans cette partie, pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans de nombreuses pathologies.

Résultats

*"En essayant continuellement on finit par réussir.
Donc : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche"*
Devise Shadock

Rôle de la chimiokine CCL7 dans le développement de la fibrose tubulointerstitielle rénale

1. Introduction

Les résultats obtenus au laboratoire sur le récepteur B1 de la bradykinine font ressortir l'implication des chimiokines et notamment celle de la chimiokine CCL7 (198, 199). Comme nous l'avons vu dans la partie introductive, CCL7 a pour récepteurs CCR1, CCR2 et CCR3 (327). Or le blocage individuel de ces récepteurs réduit la fibrose. L'idée du projet était qu'en bloquant CCL7, l'activation de ces trois récepteurs serait diminuée.

En complément de ses effets chimiotactiques, des études décrivent des effets profibrosants de CCL7. Le traitement de fibroblastes dermiques par cette chimiokine induit l'augmentation de la transcription du gène codant pour le collagène de type I (347, 348). Cet effet est partiellement bloqué par un anticorps neutralisant du TGF β . Les effets de CCL7 sur la synthèse de protéines matricielles sont donc à la fois dépendants et indépendants du TGF β .

L'équipe à l'origine de la souris invalidée pour CCL7 a montré, par la suite, le rôle primordial de cette chimiokine dans le recrutement des monocytes de la moelle osseuse vers le sang et dans une moindre mesure, du sang vers le tissu.

Tous ces arguments laissent penser que CCL7 pourrait être impliquée à plusieurs niveaux dans le développement de la FTI.

2. But de l'étude

Dans notre étude, nous avons évalué l'effet du blocage de la chimiokine CCL7 dans le développement de la FTI induite par OUU. Pour cela des animaux sauvages (CCL7^{-/-}) ou invalidés pour CCL7 ont été obstrués pendant 3 ou 8 jours. La quantification des ARNm et l'analyse immunohistochimique ont permis d'observer les effets de la chimiokine CCL7.

3. Résultats

Dans ce modèle de néphropathie, tout comme CCL2, CCL7 est surexprimée au cours de l'obstruction par un facteur 100 à 8 jours (figure 1). Dans la cinétique de la pathologie, CCL7 a des effets différents à 3 et 8 jours. En effet, à 3 jours, l'absence de cette chimiokine réduit l'infiltrat macrophagique (figure 2), l'expression des ARNm codant pour les cytokines profibrosantes, CTGF et TGF β (figure 3) et les ARNm des marqueurs myofibroblastiques, α SMA et vimentine (figure 4). Tout ceci conduit à la diminution de l'accumulation de fibronectine mais ne modifie pas l'expression des collagènes de types I et III (figure 5). A 8 jours, le blocage de CCL7 est sans effet sur l'inflammation (figure 6), le TGF β (figure 7) et les marqueurs myofibroblastiques (figure 8). Par contre, les animaux invalidés pour la chimiokine ont moins d'ARNm codant pour le CTGF (figure 7) et de dépôts de collagène de type I (figure 9). Des résultats *in vitro* confirment ces observations. Le traitement de cellules épithéliales rénales par du CCL7 recombinant augmente l'expression des ARNm codant pour le TGF β et le CTGF à 4 heures puis à une augmentation des ARNm codant pour l' α SMA et le collagène de type I à 24 heures (figure 10). Ceci laisse penser que CCL7 aurait des effets profibrosants via la stimulation de l'expression des cytokines profibrosantes. Il serait intéressant d'ajouter au traitement par la chimiokine, des anticorps neutralisants du TGF β ou du CTGF permettant de voir l'effet propre potentiel de CCL7. Enfin, également 8 jours après l'OUU, on observe une augmentation de l'expression des ARNm codant pour les marqueurs de lymphocytes T régulateurs, CD3, CD4, CD25, Foxp3 et IL10 chez les CCL7 $^{-/-}$ (figure 11).

4. Discussion

Nous avons étudié le rôle de la chimiokine CCL7 dans le développement de la FTI induite par OUU et observé que ces effets divergeaient en fonction du stade de la pathologie. Dans les phases précoces, trois jours après l'OUU, l'absence de CCL7 réduit l'influx de cellules monocytaires, l'expression des cytokines profibrosantes, TGF β et CTGF ainsi que les marqueurs myofibroblastiques. En parallèle, l'expression de la fibronectine est significativement plus basse chez les animaux CCL7 $^{-/-}$ alors que celle des collagènes de

types I et III n'est pas modifiée. A l'inverse, pour des temps plus tardifs, huit jours après OUU, l'absence de CCL7 est sans effet sur l'inflammation ou l'accumulation de myofibroblastes mais diminue l'expression du CTGF et du collagène I, suggérant un découplage entre l'inflammation et la réponse fibrosante. Nos études *in vitro* confirment ces résultats, laissant penser que CCL7 pourrait induire directement la fibrose. Lorsque des cellules tubulaires épithéliales humaines sont traitées avec de la chimiokine CCL7 recombinante, on observe une surexpression transitoire du CTGF et du TGF β , 4 heures après le traitement puis une augmentation du collagène de type I à 24 heures.

Dans les phases précoces de l'OUU, CCL7 induit le recrutement des cellules monocytaires dans l'espace tubulointerstitiel. Ceci est en accord avec les propriétés chimioattractantes qu'a CCL7 sur les monocytes (327). Elle permet la mobilisation de ces cellules de la moelle osseuse vers le sang puis du sang vers les tissus inflammés (328, 344). CCL7 est un agoniste de CCR1, CCR2 et CCR3. Comme nous l'avons vu dans la partie introductive, le blocage pharmacologique ou génétique de ces récepteurs contribue à réduire l'inflammation et l'accumulation de MEC. En tant que ligand de ces trois récepteurs, les effets observés pour CCL7 dans notre étude pourrait être la résultante du blocage des CCR1, CCR2 et CCR3. Le système des chimiokines est redondant mais nos résultats montrent que l'absence d'une seule protéine est capable de réduire l'inflammation.

La séquence d'évènements menant à la FTI est bien identifiée. L'inflammation mène à l'augmentation de la sécrétion des cytokines profibrosantes qui, à leur tour, stimulent l'apparition et la prolifération des myofibroblastes et la production de protéines matricielles (34, 365, 366). Les diminutions de CTGF, TGF β , α SMA, vimentine et fibronectine peuvent être le résultat de la diminution de l'inflammation. En effet, durant les phases précoces de l'OUU, les macrophages sont délétères pour le rein. De nombreuses études montrent que la réduction de l'inflammation diminue l'accumulation de la MEC (198, 257, 367).

De façon intéressante, pour un temps plus tardif, l'absence de CCL7 est sans effet sur le recrutement des macrophages, mais nous observons une diminution de l'expression du CTGF et du collagène de type I. Ceci laisse penser à des effets de CCL7 indépendants de l'inflammation. Nos résultats *in vitro* confirment que CCL7 peut directement induire l'expression du CTGF, du TGF β et du collagène de type I. En effet,

chez l'animal CCL7^{-/-}, l'expression du CTGF est réduite à 3 et 8 jours post-OUU, et l'accumulation du collagène de type I est diminuée à 8 jours. Ces observations sont en accord avec celles faites sur des fibroblastes de peau qui surexpriment le TGF β et le collagène I en réponse à un traitement par CCL7 (347, 348). Ces effets sont partiellement inhibés par des anticorps anti-TGF β , suggérant des effets profibrosants dépendants et indépendants du TGF β .

Huit jours après OUU, CCL7 ne modifie pas le recrutement macrophagique. Le système étant redondant, d'autres chimiokines peuvent compenser ce manque et maintenir l'influx de monocytes. Toutefois, CCL7 est une chimiokine pléiotropique qui peut agir sur plusieurs types de leucocytes. Afin de vérifier le recrutement d'autres leucocytes, nous avons réalisé des expériences de qPCR afin de quantifier les différentes chimiokines, leurs récepteurs et les marqueurs de lymphocytes B, lymphocytes T, neutrophiles, macrophages M1 et M2 et cellules dendritiques. Nous avons observé une augmentation des marqueurs CD3, CD4, CD25, foxp3 et IL10, 8 jours après l'OUU. Ces marqueurs sont caractéristiques d'une sous-population de lymphocytes T, les T régulateurs (63). Ces leucocytes sont les cellules anti-inflammatoires les plus puissantes via la sécrétion de la cytokine, IL10. Les T reg sont diminués chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, suggérant une association entre ces cellules et la fibrose (64). La cytokine anti-inflammatoire IL10 est impliquée dans la résolution de la néphrose induite par l'adriamycine (65). En effet, dans un modèle de néphrectomie subtotale, l'IL10 réduit la sécrétion des chimiokines CCL2 et CCL5, ainsi que le recrutement des macrophages et cellules dendritiques, et la fibrose (368). De plus, dans un environnement inflammatoire, l'IL10 bloque la dessensibilisation des récepteurs CCR1, CCR2 et CCR5 mais permet également leur découplage avec les protéines G dans des cellules dendritiques et des monocytes (369). Ces récepteurs deviennent des pièges à chimiokines en les fixant et les internalisant pour qu'elles soient dégradées. Au vu de ces résultats, CCL7 serait une chimiokine inhibant le recrutement de ces lymphocytes T régulateurs. Huit jours après OUU, l'inflammation n'est pas modifiée. Toutefois, il sera intéressant de compléter ces premières observations par la quantification en cytométrie des lymphocytes T reg et la quantification de l'inflammation à un temps plus tardif (14 jours d'OUU).

5. Conclusion

En résumé, à 3 jours d'OUU, le blocage de CCL7 conduit à la réduction de l'inflammation et de toutes les étapes qui en découlent. A 8 jours, seules les expressions du CTGF et du collagène de type I sont diminuées. Ces modifications peuvent être directement dues aux effets profibrosants de CCL7 observés *in vitro* ou indirectement la conséquence à long terme des effets anti-inflammatoires décrits à 3 jours. Enfin, un dernier effet bénéfique du blocage de CCL7 pourrait être l'augmentation du recrutement de lymphocytes T régulateurs. Les études à des temps d'OUU plus longs permettront de vérifier cette hypothèse. En conclusion, ces résultats montrent pour la première fois que l'absence de CCL7 diminue la FTI rénale induite par OUU.

6. Perspectives

Cette étude peut servir de preuve de concept au blocage de CCL7 dans le traitement de la FTI. Le modèle d'OUU utilisé présente les avantages de reproduire toutes les étapes du développement de la FTI décrites précédemment, d'être rapide et très reproductible. Toutefois, les pathologies rénales humaines se développent sur le long cours. Le blocage de CCL7 ayant fait ses preuves dans l'OUU, il serait intéressant de poursuivre cette étude dans des modèles physiopathologiques plus chroniques tels que la glomérulonéphrite induite par sérum néphrotoxique, la néphrectomie subtotale ou encore une obstruction urétérale partielle.

Dans notre étude, le blocage de CCL7 est obtenu par invalidation génétique chez des souris, or l'on sait que de telles constructions peuvent conduire à des phénomènes de compensation. Ainsi évaluer le blocage de CCL7 au moment de l'induction de la pathologie permettrait d'éviter ces phénomènes compensatoires. Avec le service de microchirurgie de l'institut, nous avons validé un modèle d'injection de plasmides par voie urétérale rétrograde. Cette technique consiste à injecter par l'uretère des plasmides couplés à un agent de transfection, dans le bassin. L'uretère est ensuite ligaturé au dessus du point d'injection des plasmides. Cette UUO a pour fonction, à la fois, de maintenir les vecteurs dans le rein, mais aussi, d'induire la pathologie. Grâce à ce modèle,

nous avons réussi à surexprimer la forme humaine de CCL7 dans le rein de souris et ce, au moins jusqu'à 5 jours après l'OUU. Pour les études futures, l'injection de vecteurs codant pour des siRNA dirigés contre CCL7 présenterait le double avantage de ne bloquer CCL7 qu'au moment de l'induction de la pathologie mais également de ne le faire que dans le rein. Ce modèle serait l'équivalent d'un Knock Out tissu spécifique et inducible.

Enfin, si l'on voulait mimer encore de plus près ce qui est rencontré en conditions cliniques, il faudrait bloquer CCL7 sur une FTI déjà installée. En effet, les pathologies rénales sont, encore à l'heure actuelle, détectées à des stades avancés. De ce fait, les traitements débutent sur des tissus présentant déjà des lésions, parfois importantes. A ce jour, il n'existe pas de molécule capable de bloquer CCL7 ou d'antagoniser ses récepteurs.

L'étude de CCL7 dans le développement de la FTI n'en est qu'à ses débuts et les études complémentaires présentées ici permettront de mieux évaluer le potentiel thérapeutique de l'invalidation de CCL7.

Differential effects of chemokine CCL7/MCP-3 in the development of renal fibrosis

Julien Gonzalez^{1,2}, Sofia Mouttalib^{1,2}, Mathieu Miravete^{1,2}, Christine Delage^{1,2}, Denis Calise^{2,3}, Jean-José Maoret^{2,4}, Jean-Philippe Pradère^{2,5}, Julie Klein^{1,2}, Betty Van der Veen⁶, Israel F. Charo^{7,8}, Peter Heeringa⁶, Johan Duchene⁹, Jean-Loup Bascands^{1,2*}, Joost-Peter Schanstra^{1,2*}

¹INSERM, U858/I2MR, Department of Renal and Cardiac Remodeling, Team 5, Toulouse, France;

²Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France;

³INSERM, Zootechny Department of Experimental Micro-Surgery, Toulouse, France;

⁴INSERM, Quantitative Transcriptomics Facility, Toulouse, France;

⁵INSERM, U858/I2MR, Department of Metabolism and Obesity, Team 3, Toulouse, France;

⁶Department of Pathology and Medical Biology University Medical Center Groningen, Hanzeplein 1, Groningen, Netherlands;

⁷Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, California, USA.

⁸Department of Medicine, University of California, San Francisco, USA.

⁹Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany

* Correspondence, jean-loup.bascands@inserm.fr or joost-peter.schanstra@inserm.fr

Running headline: Chemokine CCL7 in renal fibrosis

Abstract

Inflammation is a key event in the development of renal fibrosis. But the effects of inflammation can differ depending on the stage of the pathology. Chemokines have been identified as important mediators of inflammation and reported to be involved in the development of renal fibrosis. In this study, we identify chemokine CCL7 as a new player in the development of renal fibrosis with differential effects in the early- and late-stages of unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced fibrosis. At an early stage, three days after UUO, the absence of CCL7 reduced renal inflammatory cell infiltration, expression of profibrotic cytokines TGF β and CTGF and myofibroblast markers. In parallel the expression of the ECM protein fibronectin was significantly lower in mice lacking CCL7, while type I and III collagen expression was not modified. In contrast, at a later stage, 8 days after UUO, the absence of CCL7 was without effect on inflammation or myofibroblast accumulation but decreased the expression of CTGF and type I collagen, suggesting uncoupling between inflammation and the fibrotic response. *In vitro* studies confirmed these results suggesting that CCL7 can directly induce a fibrotic response *via* induction of CTGF and TGF β . In addition, at this late stage the absence of CCL7 induced the increase of markers of anti-inflammatory regulatory T cells. These observations and the fact that CCL7 is an agonist of three different chemokine receptors makes CCL7 blockade an interesting alternative as compared to other chemokines in the search for new molecules to treat the development of renal fibrosis.

Introduction

End-stage renal disease (ESRD) is the consequence of a variety of renal disorders characterized by extracellular matrix (ECM) accumulation and the loss of glomerular structure that lead to impaired kidney function (1). ECM accumulation (fibrosis or sclerosis), can affect glomeruli (glomerulosclerosis), renal vasculature or interstitial space (tubulointerstitial fibrosis, TIF). The latter has been shown to be strongly correlated with the future loss of renal function (2, 3).

The development of TIF can be schematically described as a succession of three steps (1). *Inflammation* (4-6): Tissue injury induces secretion of chemoattractant proteins that recruit immune cells, mainly monocytes, macrophages and T lymphocytes, from blood to the inflammatory site (5, 7). These cells produce large amounts of the profibrotic cytokine transforming growth factor beta (TGF β) (6, 8, 9) which in turn induces another profibrotic cytokine, connective tissue growth factor (CTGF) (9, 10). *Myofibroblast accumulation*: The second step, which is in part due to these cytokines, leads to appearance of a new cell type in the kidney: myofibroblasts. Their precise origin is still debated. They might derive from resident fibroblasts, pericytes, endothelial cells (via a endothelial-to-mesenchymal transition (Endo-MT)), renal or bone marrow derived stem cells or tubular epithelial cells (epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)) (3, 11). The number of these cells is correlated with the severity of TIF and subsequently to the loss of kidney function (12). *ECM accumulation*: Myofibroblasts induce the third step, accumulation of ECM proteins, by their ability to produce high quantities of extracellular matrix (ECM) proteins like collagens and fibronectin.

Unilateral ureteral obstruction (UUO) is a well-characterized model of nonimmunological tubulointerstitial fibrosis. It mimics the different stages of development of TIF within 1 week in a very reproducible manner (6-8). Moreover, UUO-induced TIF is independent of proteinuria, hypertension, exogenous toxin or uremic environment (3, 11).

Inflammation is a key and early event in the development of TIF. But, its effects can be either pro- or anti-fibrotic depending on the stage of the pathology. Indeed, it has been shown that macrophages are deleterious in the early phase of fibrosis while renoprotective in the chronic phase (7). Therefore, insight into the mechanism responsible for monocyte recruitment and activation is important for the better understanding of the development of renal fibrosis. Monocyte extravasation is induced by a class of cytokines called chemokines (13-18). These chemotactic cytokines are divided in 4 families (CCL, CXCL, XCL and

CX3CL) based on the position of 2 conserved cysteines (19, 20). The chemokine system is redundant because one ligand can have more than one receptor and can share its receptors with other chemokines (19, 20). Indeed, CCL5 (RANTES) binds to chemokine receptor CCR1, CCR3, CCR5 and CCR2 can be bound by CCL2, CCL7, CCL8, CCL13. In the kidney, chemokines have been proposed as new potential targets for treatment of chronic inflammatory diseases (21-23).

The CCL family is the most potent effector of monocyte influx (14, 15, 17, 19). A prominent member of this family, CCL2 (MCP-1) and the corresponding CCR2 receptor has been largely studied in different experimental nephropathies including crescentic nephritis (24), hemolytic-uremic syndrome (25), unilateral ureteral obstruction (UUO) (26), diabetic nephropathy (27) and glomerulonephritis (28). In all studies, CCL2 blockade decreased renal lesions.

Another member of this family, CCL7 (MCP-3) is also an agonist of CCR2. In addition, CCL7 also binds CCR1, CCR3 (29) and is a natural antagonist for CCR5 (30). CCL7 is therefore potentially involved in a number of (inflammatory) processes. It has been observed that CCL7 is important for monocyte mobilization from bone marrow to blood and from blood to the inflammatory site (31). Besides these proinflammatory effects, CCL7 has been shown to directly stimulate type I collagen expression by skin fibroblasts *in vitro* (32) and work in concert with TGF β (by reciprocal induction) on collagen synthesis (33). Finally, at the intersection between those proinflammatory and profibrotic effects, a study showed that CCL7 is a homing factor for mesenchymal stem cells after myocardial infarction (34). All these observations lead us to investigate the role of CCL7 in the development of UUO-induced TIF.

Results

Renal CCL7 expression is increased in experimental tubulointerstitial fibrosis

As a first step to determine the role of CCL7 in the development of renal fibrosis we studied CCL7 expression in unilateral ureteral obstruction (UUO), a well established model of tubulointerstitial fibrosis (6-8). As previously reported (36), UUO induced expression of chemokine CCL2 and CCL5 (figure 1a, b) reaching expression levels up to 110- and 16-fold, respectively, after 8 days of obstruction. CCL7, three days after surgery, showed a 28-fold increase in mRNA expression compared to non obstructed mice (figure 1c). This induction was maintained throughout 8 days of obstruction reaching a 97-fold increase at 8 days of UUO.

Early inflammation is reduced in CCL7-KO mice.

This induction of CCL7 mRNA, in analogy with the effects of CCL2 (24-28, 37) and CCL5 (24, 37, 38) on the development of TIF, suggested that CCL7 could be an important actor in the development of TIF. Therefore, to better understand the role of CCL7 in fibrosis, we subjected CCL7 knockout mice (CCL7-KO, (31)) to UUO. CCL7 has been initially described as a potent chemoattractant for monocytes/macrophages (39). We first analysed the inflammatory phase, by analysing F4/80-expression, in UUO-induced tubulointerstitial fibrosis. F4/80 mRNA levels were 20% lower in CCL7-KO mice 3 days after UUO (Figure 2a). Subsequent F4/80 immunostaining on kidney sections confirmed this 20% decrease in F4/80 positive cells in CCL7-KO mice (Figure 2b, c). This suggests that CCL7 is involved in the early stages of tubulointerstitial fibrosis by modulation of inflammatory cell recruitment. In the next step we analysed the consequences of this reduction on the development of renal tubulointerstitial fibrosis.

CCL7 induces the profibrotic cytokines, TGF β and CTGF, and myofibroblasts accumulation.

TGF β and CTGF are the main profibrotic cytokines involved in fibrogenesis (6, 8-10). Both cytokines are involved in fibroblast activation and epithelial-to-mesenchymal transition that leads to myofibroblast accumulation (11, 12). Myofibroblasts are the main ECM producing cells (11, 12). We analysed the expression of TGF β and CTGF (figure 3a, b) and two markers

(α SMA and vimentin) of myofibroblasts (figure 4a, b). TGF β and CTGF mRNA expression was 50 % lower in CCL7-KO mice compared to WT mice 3 days after UUO. Myofibroblast marker mRNA, α SMA and vimentin decreased by 30 % and 35 %, respectively, in the absence of CCL7. We next analysed whether the overexpression of these profibrotic markers impacted on the ECM production.

CCL7 selectively modulates extracellular matrix protein accumulation.

The end-point of UUO-induced fibrosis is the accumulation of extracellular matrix proteins including collagens and fibronectin (1, 8, 9). We therefore analysed type I (figure 5a, d) and III (figure 5b, e) collagens and fibronectin (figure 5c, f) expression. The absence of CCL7 didn't reduce type I and III collagen expression levels after 3 days of UUO. However fibronectin protein expression was found to be decreased by 35 % in CCL7-KO mice (Figure 5c, f).

Taken together the above data obtained at day 3 post-UUO, strongly support the involvement of CCL7 in the early inflammatory and fibrotic processes since the lack of this chemokine is associated to reduced inflammation, profibrotic cytokines, myofibroblast markers and fibrosis.

CCL7 has limited effects on the later phases of UUO-induced TIF.

We next assessed the long-term effects of CCL7-KO on the development of renal fibrosis. After 8 days of UUO fibrosis is well established and replaces tubular structures. In addition, inflammation creates massive accumulation of immune cells around arteries and the interstitial space is full of ECM proteins, myofibroblasts/fibroblasts and immune cells. Interestingly we observed that at this late time-point, absence of CCL7 was without effect on F4/80-positive cells (mRNA and proteins) (figure 6). In addition this was accompanied by a 50% decrease in CTGF mRNA level (figure 7b) whereas no effect was observed on TGF β in CCL7-KO (figure 7a). Myofibroblast markers, α SMA and Vimentin (figure 8) were not different between WT and CCL7-KO mice at this time point. However the lack of CCL7 induced a reduction in type I collagen staining by almost 25 % (Figure 9a, d). In contrast, type III collagen (figure 9b, e) and fibronectin (figure 9c, f) expression were not modified at this late time-point.

CCL7 directly induces profibrotic cytokines and collagens in human epithelial cells.

Our *in vivo* data suggest that CCL7 is involved in the early inflammatory response in UUO-induced TIF, but also modulates collagen I expression without modifying leucocyte recruitment at the later stages of the pathology. This apparent independency of the effects of CCL7 prompted us to explore whether CCL7 was able to directly stimulate profibrotic cytokine and collagen expression in human renal epithelial cells as it was shown for fibroblasts (32, 33). To this end Human tubular epithelial cells (HK2) were treated with human recombinant CCL7 and their ability to produce profibrotic cytokines and ECM components was tested. CCL7 treatment rapidly induced TGF β and CTGF mRNA expression which lasted 4 h for CTGF and 8 h for TGF β (figure 10a). In addition at a later stage, 24 h after treatment, CCL7 induces α SMA mRNA induction in HK2 cells (figure 10b). Overexpression of α SMA mRNA at this later stage was accompanied by increased type I collagen mRNA expression while no effect was observed for type III collagen (figure 10c). Consistent with our *in vivo* data, we observed differential effects of CCL7 at early and late stages after CCL7 treatment of HK2 cells.

CCL7 inhibits regulatory T lymphocytes recruitment in later UUO-induced fibrosis

To further explore the absence of an effect on macrophage infiltration after 8 days of UUO we decided to screen for modification of expression of other immune cell markers (CDs, cytokines, chemokines, chemokine receptors) by qPCR to verify whether CCL7 could modify the type of immune cells that is recruited in the kidney during tubulointerstitial fibrosis. For the T lymphocyte lineage a 33 % increase in expression of CD3e mRNA was observed in the CCL7-KO strain after 8 days of UUO (figure 11a). As CD3e does not discriminate between the different T cells we analysed CD4, CD25 and foxp3 mRNA expression. The expression of those three markers also increased in the CCL7 KO mice (figure 11b, c, d), suggesting an increase in the regulatory T cell influx in the absence of CCL7. As regulatory T cells produce the anti-inflammatory cytokine IL-10, we also analysed IL-10 mRNA expression. Interestingly IL-10 mRNA expression was higher in CCL7KO mice after 8 days of obstruction (figure 11e). Expression of these markers was not different between control and knockout mice at the early time-point (data not shown). These results suggest that CCL7 blocks T reg recruitment and subsequently production of IL10.

Discussion

We studied the role of the chemokine CCL7 in UUO-induced TIF and observed that the role of CCL7 differs depending on the stage of the pathology. At an early stage, three days after UUO, the absence of CCL7 reduced renal inflammatory cell infiltration, expression of profibrotic cytokines TGF β and CTGF and myofibroblast markers. In parallel the expression of the ECM protein fibronectin was significantly lower in the CCL7KO mice while type I and III collagen expressions were not modified. In contrast, at a later stage, 8 days after UUO, the absence of CCL7 was without effect on inflammation or myofibroblast accumulation but decreased expression of CTGF and type I collagen, suggesting uncoupling between inflammation and the fibrotic response. *In vitro* studies confirmed these results suggesting that CCL7 can directly induce a fibrotic response. When human epithelial tubular cells were treated with recombinant CCL7, there was a transient induction of CTGF and TGF β at 4 hours, and an increased expression of type I collagen at the 24 h late time-point.

At the early stages of the fibrotic response to UUO, CCL7 induces monocytic lineage cell recruitment in the tubulointerstitial space. This agrees with the well known characteristic of CCL7 as a potent chemotactic factor for monocytes that allows the mobilization of these cells from the bone marrow to the blood and then from the blood to inflamed tissue (31, 39). CCL7 is an agonist for the CCL family receptors, CCR1, CCR2 and CCR3. Individual knockouts of these CCR receptors, either genetic or pharmacological, result in most cases in reduced inflammation and reduced fibrosis. Genetic (40) or pharmacological (41) blockade of CCR1 in murine obstructive nephropathy reduces inflammation and subsequent tubulointerstitial fibrosis (42). CCR2, which is the CCL2 receptor, was also largely studied. Genetic invalidation of CCR2 protects kidney from ischemia-reperfusion injury (43) and CCR2 antagonists reduce fibrosis in a model of UUO-induced TIF (44). The third receptor, CCR3 is well known in the development of lung fibrosis where its blockade by an antagonist (45) or an antibody (46) decreases fibrosis. These studies suggest that blocking a CCR receptor is effective to reduce inflammation and fibrosis. As a ligand for these three receptors, the effects observed for CCL7 in our study could result from inhibition of CCR1, CCR2 and CCR3. However, as the chemokine system is redundant (19, 20), other chemokines could compensate for the observed CCL7 effects, but our results show that the single lack of CCL7 is able to reduce inflammation. In the same way, another study demonstrated that the blockade of CCL2 reduces the monocyte influx in the kidney (26).

The sequence of events in UUO-induced TIF is well understood. Inflammation leads to an increased expression by inflammatory cells of profibrotic cytokines which in turn, stimulate proliferation of fibroblasts and ECM protein synthesis (3, 4, 6, 47). The subsequent reduction of CTGF, TGF β , α SMA, vimentin and fibronectin may be the result of the lower inflammation. Indeed, during the earlier phase of UUO-induced TIF, macrophages are deleterious for the kidney. Numerous studies highlight that decrease inflammation leads to ameliorate ECM accumulation (26, 48, 49).

Interestingly, at a later time point, the loss of CCL7 was without effect on macrophage recruitment, but we observed a decreased expression of CTGF and type I collagen suggesting inflammation-independent effects of CCL7. Our *in vitro* experiments showed that CCL7 can directly promote CTGF, TGF β and collagen I expression which can explain the *in vivo* results where the absence of CCL7 expression leads to decreased expression of CTGF at 3 and 8 days after UUO and of type I collagen at 8 days post-UUO. This agrees with the observation that CCL7 can directly stimulate TGF β and subsequently type I collagen expression in dermal fibroblasts (32, 33). These effects on dermal fibroblasts are only partially inhibited by TGF β antibodies, suggesting TGF β -dependent and -independent profibrotic effects. In analogy to its effect on tubular cells, CCL7 could also directly act on renal fibroblasts to increase profibrotic cytokines and type I collagen expression, but this remains to be established.

At the late time point, CCL7 was without effect on macrophage recruitment as studied by F4/80 quantification. Other chemokines could compensate the lack of CCL7 and maintain macrophage level in the kidney and CCL7, which is a pleiotropic chemokine, could also modify the recruitment of other white blood cells that were not specifically detected by F4/80 staining. To test this hypothesis, we performed qPCR experiments to determine the expression of chemokines able to replace CCL7 as well as the expression of a number of markers for B and T cells, neutrophils, M1 and M2 macrophages or dendritic cells. Interestingly, mRNA expression levels of CD3, CD4, CD25, Foxp3 and IL-10 are increased in the 8-days obstructed kidney in CCL7KO mice. These markers are characteristic for a subset of T cells, called regulatory T cells (Treg (50)). They are the most potent anti-inflammatory cells by secreting the cytokine IL10 and shown to be involved in resolution of adriamycin nephrosis (51). Furthermore, these cells are downregulated in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, suggesting an association between Treg number and fibrosis (52). In an inflammatory environment, IL-10 blocks the downregulation of chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 but induces the uncoupling of these receptors with their G-proteins in dendritic cells

and monocytes. In a model of subtotal nephrectomy, IL-10 decreases chemokine expression (CCL2, CCL5), macrophage and dendritic cell recruitment and fibrosis (53). These receptors become scavengers by trapping and removing of inflammatory chemokines from the inflammatory site (54). Therefore we propose that decreased expression of type I collagen, eight days after UUO, could be the beneficial consequence of the absence of effects of CCL7 on i) tubular epithelial cells, ii) fibroblasts (32, 33) and iii) the recruitment of regulatory T cells.

In conclusion, CCL7 is involved in the development of UUO-induced renal fibrosis with differential effects at the early- and later-stages of the pathology. These observations and the fact that CCL7 is an agonist of three different CCR receptors might make CCL7 blockade an interesting alternative as compared to other chemokines in the search for new molecules to treat the development of renal fibrosis.

Methods

Animals

CCL7-KO (CCL7-KO) mice, backcrossed 10 times to C57Bl/6J mice, were obtained as described previously (31). We used C57Bl/6J (Harlan Laboratories) as wild type (WT) control mice. The mice were housed in a pathogen-free environment. All experiments reported were conducted in accordance with the NIH guide for the care and use of laboratory animals and were approved by a local animal care and use committee.

Unilateral Ureteral Obstruction (UUO)

CCL7-KO and WT male mice 8 weeks of age were used in all experiments. Unilateral ureteral ligation was performed as previously described (35). Briefly, under oxygen-isoflurane anesthesia and through a longitudinal, left abdominal incision, the ureter was exposed and ligated with a 6/0 nylon thread at the uretero-pelvic junction. In sham operations, the ureter was exposed but not ligated and repositioned. Mice were maintained on standard mouse chow and tap water. At the end of the protocol, mice were sacrificed, and the kidneys were removed and divided in different parts according to the different protocols employed. For mRNA extraction kidney sections were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until mRNA extraction. For histology kidney sections were fixed in Carnoy's solution for 24 h, dehydrated by respectively 5 and 3 successive baths with absolute ethanol and acetone and embedded in paraffin.

Histological analysis and immunohistochemistry

Four-micrometer paraffin-embedded sections were used for immunohistochemistry. Sections were first de-waxed in Ottix Plus (Diapath) and rehydrated through a series of graded ethanol washes before endogenous peroxidase blockage (S2001, DakoCytomation). Primary antibodies were incubated at room temperature for the detection of collagen type I (1/250, 30 min, CL50151AP, Cedarlane), type III collagen (1/200, 30 min, BP8014, Acris Antibodies), F4/80 positive inflammatory cells (1/100, 45 min, RM2900, Caltag Laboratories, followed by rabbit anti-rat IgG, 1/200, 45 min, 612-4326, Rockland) and fibronectin (1/400, 30 min, F3648, Sigma). For visualization we used the anti-rabbit IgG Dako Envision HRP system (30 min, K4002, DakoCytomation) and a DAB substrate (10, min, TA-125-HDX, Thermoscientific). Sections were counterstained with hematoxylin. Negative controls for the

immunohistochemical procedures included substitution of the primary antibody with nonimmune sera.

Histomorphometric analyses were performed as previously described (35) using a commercially available image-analysis software which allows rebuilding of a kidney section from adjacent individual captures (Explora Nova Mosaic software, La Rochelle, France).

Isolation of RNA

Total RNA was isolated from frozen mouse tissue or cells using Qiagen RNeasy Plus Mini kit, eluted in respectively 50 or 30 μ l RNase-free water according to the manufacturer's protocol. 1.5 μ l of this solution was used for quantification by a NanoDrop instrument (ND-1000 spectrophotometer).

Quantification of gene expression by real-time quantitative PCR

mRNA expression analysis in cell culture studies was performed on a StepOne instrument (Applied) using real-time PCR. PCR amplification was performed in a total volume of 20 μ l containing 10 ng of cDNA sample, 300 nM of forward and reverse primer and 10 μ l of DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kit (F-415L, Finnzymes). The reaction mixture was preheated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. 18S ribosomal RNA (18S) was used for normalisation.

mRNA expression in animal studies was analyzed using the Fluidigm dynamic array (Fluidigm). In collaboration with the manufacturer, we developed a protocol for Eva Green dye (Biotium). Briefly, cDNA was pre-amplified in a total volume of 5 μ l containing 5 ng of sample, 50 nM of forward and reverse primer and 2.5 μ l of Taq man PreAmp Master Mix (Applied biosystems). The pre-amplification program included an initial denaturing step at 95°C for 10 min followed by 14 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 4 min. In the next step the pre-amplified DNA was diluted 1/5 and 1.5 μ l of this dilution was added to 3 μ l TaqMan Gene Expression Master mix (Applied biosystems), 0,3 μ l DNA binding dye sample loading reagent (Fluidigm), 0,3 μ l Eva Green (Biotium) and 0,9 μ l TE buffer. Each of the above sample mix is added to a column and 5 μ l of a mix containing 5 mM of forward and reverse primer for each gene and 0.25 % Tween 20 in low EDTA TE buffer (100 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) is added to the rows. At the intersection of each column and row, sample and primers mix and allow determining the expression of a specific gene in a specific sample. The Fluidigm 96x96 qPCR thermocycling program on a BioMark (Fluidigm) is used for

amplification. For the experiments with the mouse UUO model mouse, GAPDH was used as the gene for normalization.

Cell culture

Human tubular proximal cells (HK2) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO) with 4.5g/L glucose and 10% fetal calf serum at 37°C, 5% CO₂. Cells were seeded in 6-well plates and were treated for 4, 8 or 24 h with 100 mg/ml of human recombinant CCL7 in the same medium but without fetal calf serum.

Statistical analysis

Data are expressed as mean plus or minus SD. One-way ANOVA with post hoc Tukey alpha test or Two-way ANOVA with Bonferroni post-test were performed for comparison between the different groups. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Bibliography

1. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 2005; **365**: 331-340.
2. Hewitson TD. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**: F1239-1244.
3. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; **75**: 1145-1152.
4. Chevalier RL. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; **2**: 157-168.
5. Zheng G, Wang Y, Mahajan D, Qin X, *et al.* The role of tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int Suppl* 2005: S96-100.
6. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int* 2005; **68**: 925-937.
7. Nishida M, Hamaoka K. Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephron Exp Nephrol* 2008; **110**: e31-36.
8. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**: F861-875.
9. Harris DC. Tubulointerstitial renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; **10**: 303-313.
10. Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective Tissue Growth Factor-(CTGF, CCN2) - A Marker, Mediator and Therapeutic Target for Renal Fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* **114**: e83-e92.
11. Grande MT, Lopez-Novoa JM. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009; **5**: 319-328.
12. Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; **38**: 1-5.
13. Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol* 2008; **9**: 953-959.
14. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol* 2008; **9**: 949-952.
15. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; **12**: 121-127.
16. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; **338**: 436-445.

17. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; **392**: 565-568.
18. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997; **349**: 490-495.
19. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999; **20**: 254-257.
20. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; **90**: 909-928.
21. Eis V, Vielhauer V, Anders HJ. Targeting the chemokine network in renal inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004; **52**: 164-172.
22. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 152-176.
23. Rovin BH. Chemokine blockade as a therapy for renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; **9**: 225-232.
24. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, *et al.* RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997; **185**: 1371-1380.
25. Keepers TR, Gross LK, Obrig TG. Monocyte chemoattractant protein 1, macrophage inflammatory protein 1 alpha, and RANTES recruit macrophages to the kidney in a mouse model of hemolytic-uremic syndrome. *Infect Immun* 2007; **75**: 1229-1236.
26. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, *et al.* Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 940-948.
27. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 2006; **69**: 73-80.
28. Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int* 1999; **56**: 135-144.
29. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw* 2001; **12**: 554-560.
30. Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, *et al.* CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 1999; **94**: 1899-1905.
31. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, *et al.* Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007; **117**: 902-909.

32. Ong VH, Evans LA, Shiwen X, Fisher IB, *et al.* Monocyte chemoattractant protein 3 as a mediator of fibrosis: Overexpression in systemic sclerosis and the type 1 tight-skin mouse. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 1979-1991.
33. Ong VH, Carulli MT, Xu S, Khan K, *et al.* Cross-talk between MCP-3 and TGFbeta promotes fibroblast collagen biosynthesis. *Exp Cell Res* 2009; **315**: 151-161.
34. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, *et al.* Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells* 2007; **25**: 245-251.
35. Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, *et al.* In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest* 2002; **110**: 371-379.
36. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, *et al.* Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1173-1187.
37. Wu H, Wang Y, Tay Y-C, Zheng G, *et al.* DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin nephropathy. *Kidney International* 2005; **67**: 2178-2186.
38. Song E, Zou H, Yao Y, Proudfoot A, *et al.* Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney International* 2002; **61**: 676-685.
39. Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 1992; **176**: 59-65.
40. Eis V, Luckow B, Vielhauer V, Siveke JT, *et al.* Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 337-347.
41. Anders H-J, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, *et al.* A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* 2002; **109**: 251-259.
42. Ninichuk V, Anders H-J. Chemokine receptor CCR1: a new target for progressive kidney disease. *Am J Nephrol* 2005; **25**: 365-372.
43. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, *et al.* CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 2503-2515.
44. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, *et al.* Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol* 2004; **165**: 237-246.
45. Komai M, Tanaka H, Nagao K, Ishizaki M, *et al.* A novel CC-chemokine receptor 3 antagonist, Ki19003, inhibits airway eosinophilia and subepithelial/peribronchial

- fibrosis induced by repeated antigen challenge in mice. *J Pharmacol Sci* 2010; **112**: 203-213.
46. Huaux F, Gharaee-Kermani M, Liu T, Morel V, *et al.* Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC chemokine receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *Am J Pathol* 2005; **167**: 1485-1496.
 47. Schlondorff DO. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney International* 2008; **74**: 860-866.
 48. Klein J, Gonzalez J, Duchene J, Esposito L, *et al.* Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J* 2009; **23**: 134-142.
 49. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney International* 2009; **76**: 1248-1257.
 50. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scandinavian Journal of Immunology* 2009; **70**: 326-336.
 51. Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, *et al.* IL-10/TGF- β -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010.
 52. Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouvelekis A, *et al.* Global impairment of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2009; **179**: 1121-1130.
 53. Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, *et al.* IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 3651-3660.
 54. D'Amico G, Frascaroli G, Bianchi G, Transidico P, *et al.* Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nature Immunology* 2000; **1**: 387-391.

Acknowledgments

This work was funded in part by 111 des Arts, the Egide-Van Gogh project and the Société de Néphrologie. JG, MM, JK were supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France). JLB was supported by INSERM and the Direction Régionale Clinique (CHU de Toulouse, France) under the Interface program.

Legends

Figure 1

UUO induces chemokine mRNA expression in WT mice.

CCL2 (MCP-1) (a), CCL5 (RANTES) (b) and CCL7 (MCP-3) (c) mRNA was quantified by real-time PCR in sham operated mice (Control) or obstructed mice for 3 or 8 days (3 or 8 days UUO). Values are means \pm SEM from 6 mice per group. Amplitudes of chemokine mRNA expression were compared by two-way ANOVA test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to Control group.

Figure 2

Early stage effects: inflammation is reduced in CCL7KO mice.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 3 days of UUO (3 days UUO) or not (Control). Inflammation is characterized by F4/80 which is a marker of monocytic lineage. (a) F4/80 mRNA was quantified by real-time PCR experiments. F4/80 proteins were detected by immunohistological staining. (b) Representative photographs. (c) Quantification of F4/80 expression. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced inflammation between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 3

Early stage effects: absence of CCL7 reduces expression of profibrotic cytokines.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 3 days of UUO (3 days UUO) or not (Control). TGF β (a) and CTGF (b) mRNA was quantified by real-time PCR. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced cytokines between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test. *** $P < 0.001$.

Figure 4

Early stage effects: absence of CCL7 reduces expression of myofibroblast markers.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 3 days of UUO (3 days UUO) or not (Control). α SMA (a) and vimentin (b) mRNA was quantified by real-time PCR experiments. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced myofibroblast markers between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test. ***P < 0.001.

Figure 5

Early stage effects: genetic blockade of CCL7 specifically reduces fibronectin accumulation.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 3 days of UUO (3 days UUO) or not (Control). Type I (a, d) and type III (b, e) collagens and fibronectin (c, f) were quantified by immunohistochemistry. (a-c) Representative photographs of type I and III collagen and fibronectin, respectively. (d-f) Quantification of type I and III collagen and fibronectin, respectively. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced ECM proteins between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test. *P < 0.05.

Figure 6

Late stage effects: genetic blockade of CCL7 is without effect on inflammation.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 8 days of UUO (8 days UUO) or not (Control). (a) F4/80 mRNA was quantified by real-time PCR experiments. F4/80 proteins are detected by immunohistological staining. (b) Representative photographs. (c) Quantification of F4/80 expression. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced inflammation between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test.

Figure 7

Late stage effects: genetic blockade of CCL7 specifically reduces CTGF but not TGF β mRNA expression.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 8 days of UUO (8 days UUO) or not (Control). TGF β (a) and CTGF (b) mRNA was quantified by real-time PCR. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced cytokines between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test. ***P < 0.001.

Figure 8

Late stage effects: absence of CCL7 is without effect on myofibroblast markers.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 8 days of UUO (8 days UUO) or not (Control). α SMA (a) and vimentin (b) mRNA was quantified by real-time PCR experiments. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced myofibroblast markers between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test.

Figure 9

Late stage effects: genetic blockade of CCL7 specifically reduces type I collagen accumulation.

CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 8 days of UUO (8 days UUO) or not (Control). Type I (a, d) and type III (b, e) collagens and fibronectin (c, f) were quantified by immunohistochemistry. (a-c) Representative photographs of type I and III collagen and fibronectin, respectively. (d-f) Quantification of type I and III collagen and fibronectin, respectively. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced ECM proteins between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test. *P < 0.05.

Figure 10

CCL7 induces expression of profibrotic cytokines and ECM in human tubular epithelial cells (HK2).

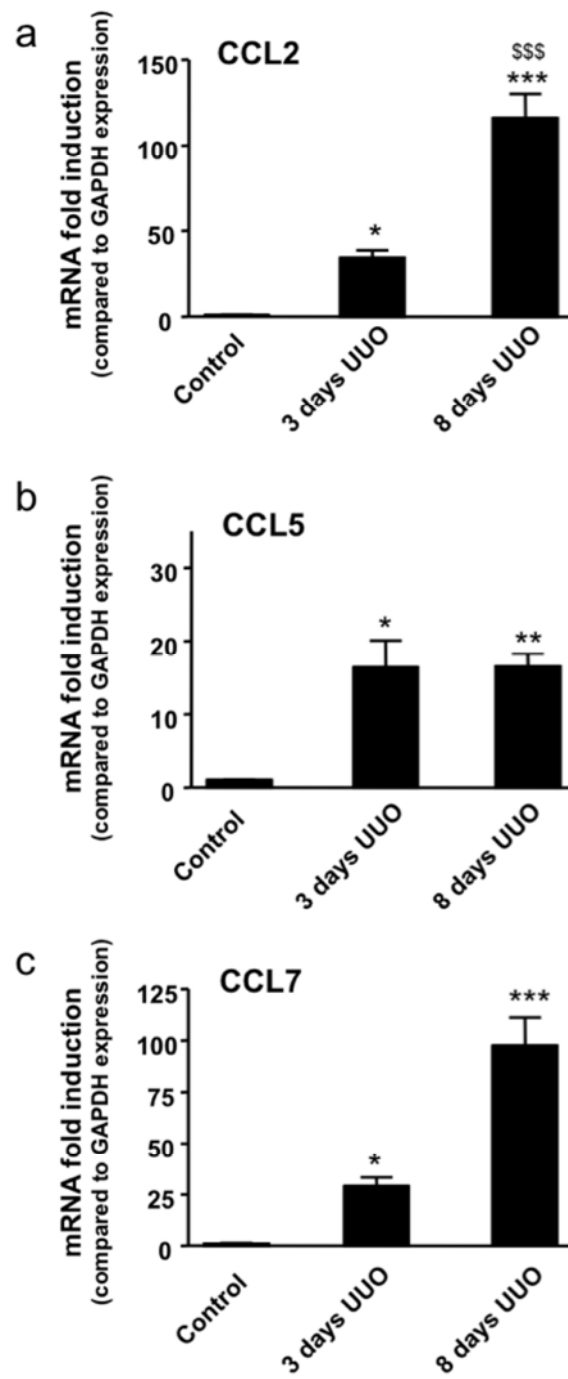
HK2 cells were treated with 100 ng/ml of human recombinant CCL7 during 4, 8 or 24 h. mRNA were extracted and profibrotic cytokines (TGF β and CTGF), myofibroblast marker (α SMA) and ECM proteins (type I and III collagens) mRNA were quantified using real-time PCR and compared to non-treated cells (0 h). (a) TGF β (triangle) and CTGF (square) expressions. (b) α SMA expression. (c) Type I (triangle) and type III (square) collagens expressions. Amplitudes of mRNA expressions between treated (4, 8 or 24 h) and non-treated cells (0 h) were compared by one-way ANOVA test. *P < 0.05, **P < 0.01.

Figure 11

Eight days after UUO, genetic blockade of CCL7 increases regulatory T cell influx.

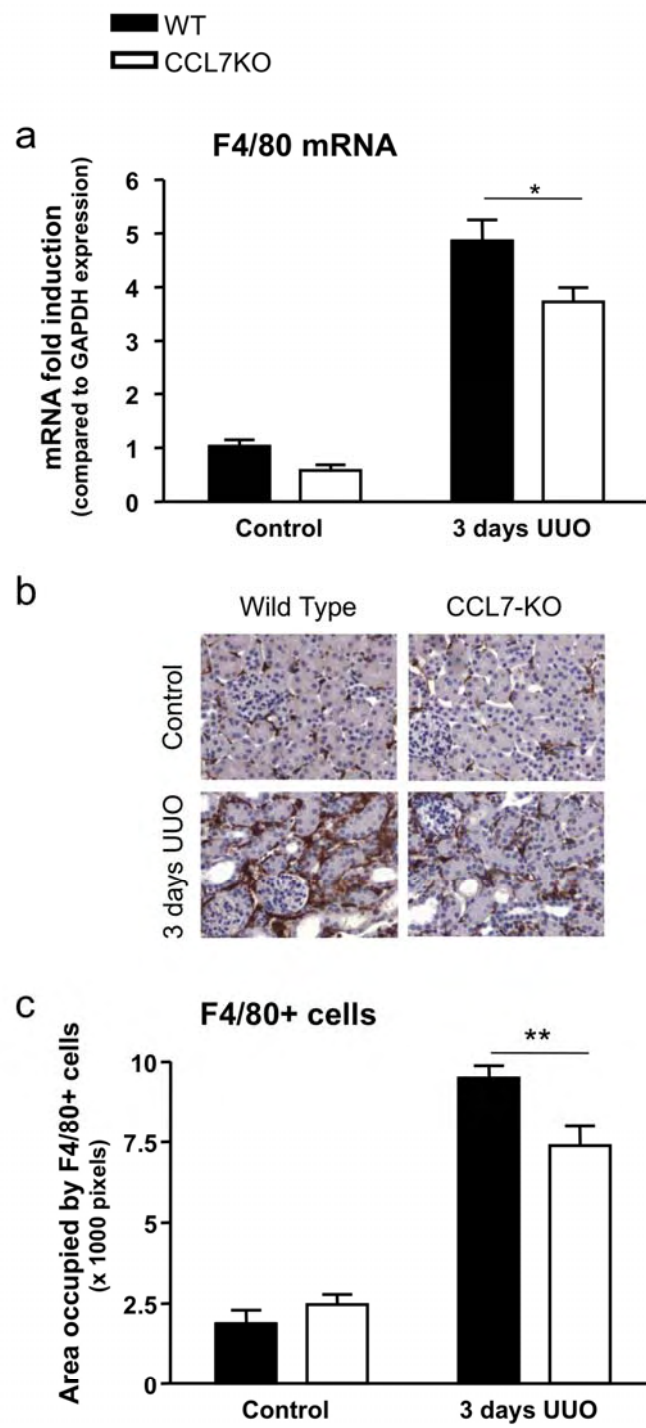
CCL7 knockout mice (CCL7KO: open bars) and their wild-type littermates (WT: black bars) were subjected to 8 days of UUO (8 days UUO) or not (Control). CD3 ϵ (a), CD4 (b), CD25 (c), foxp3 (d) and IL-10 (e) mRNA was quantified by real-time PCR. Values are means \pm SEM from 6 mice by group. Amplitudes of UUO-induced regulatory T cells markers between CCL7KO (open bars) and WT (black bars) mice were compared by two-way ANOVA test. *P < 0.05, ***P < 0.001.

Figure 1



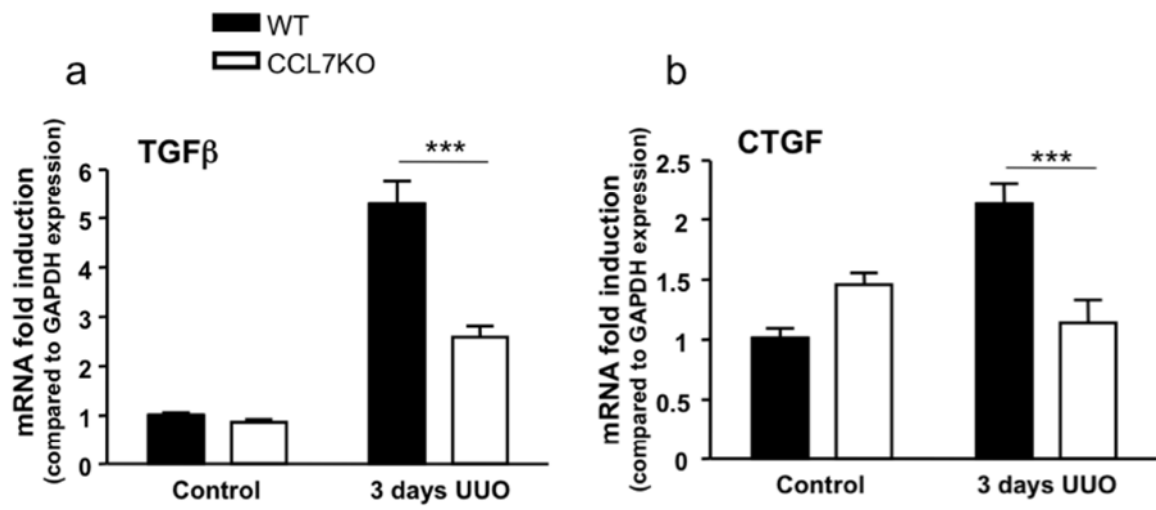
Gonzalez *et al.*

Figure 2



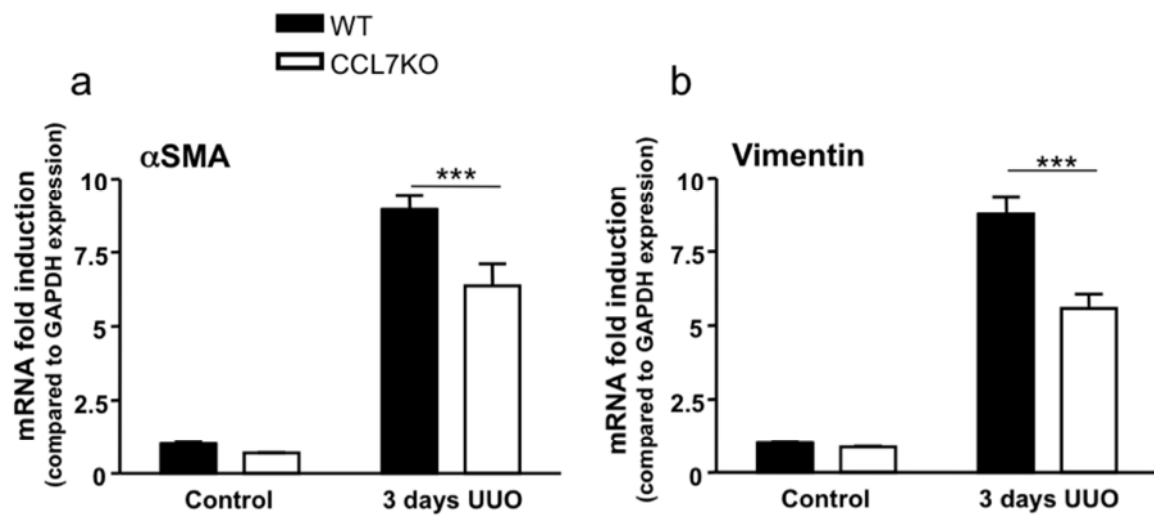
Gonzalez *et al.*

Figure 3



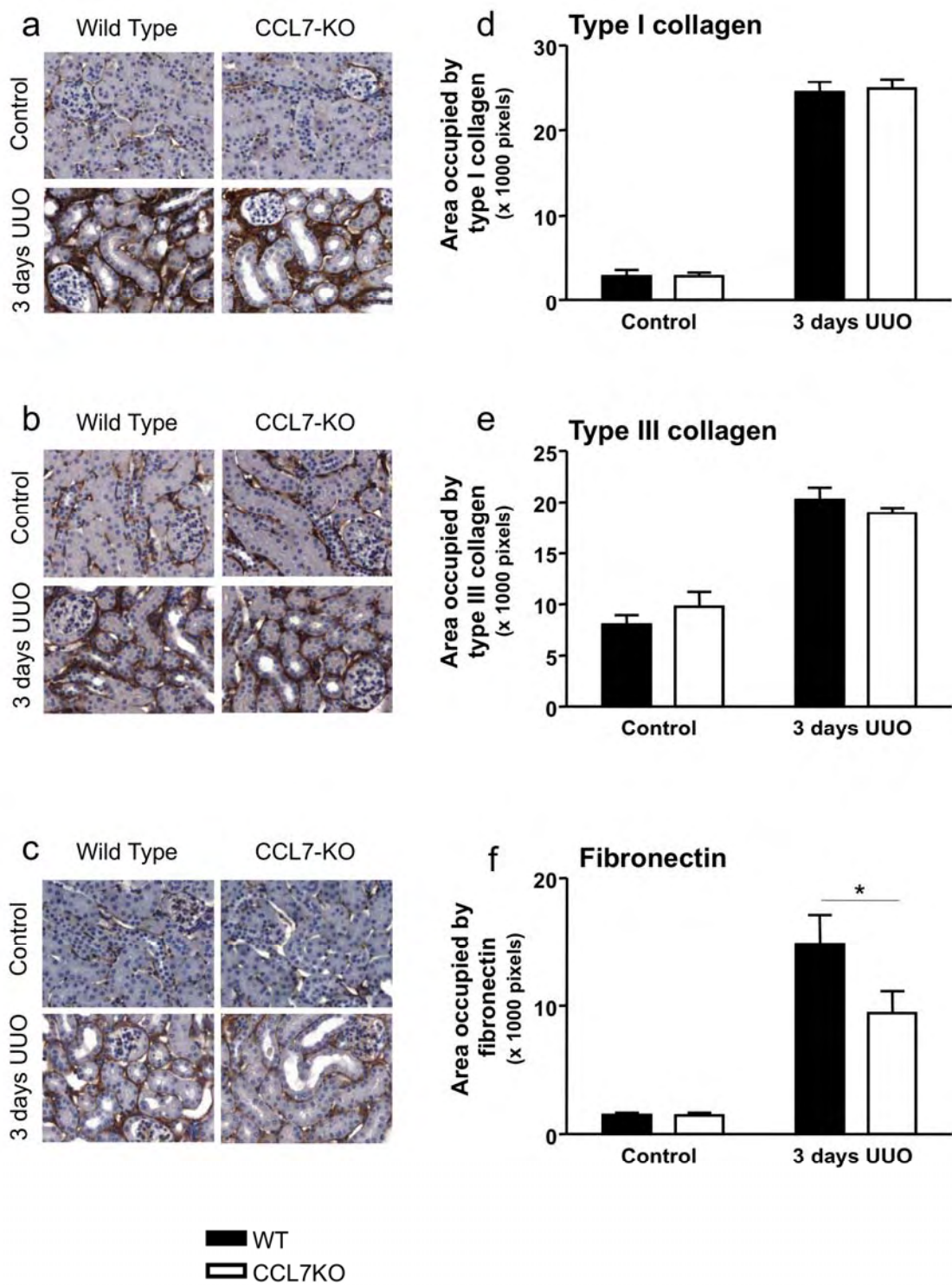
Gonzalez *et al.*

Figure 4



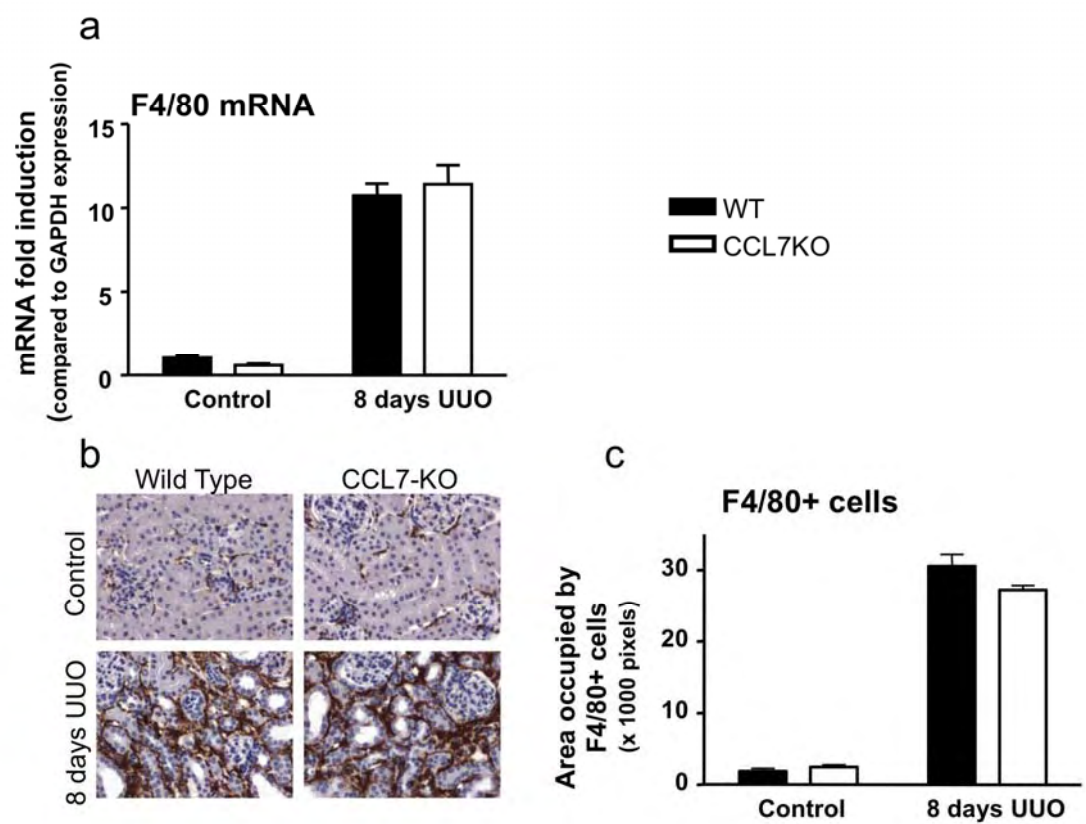
Gonzalez *et al.*

Figure 5



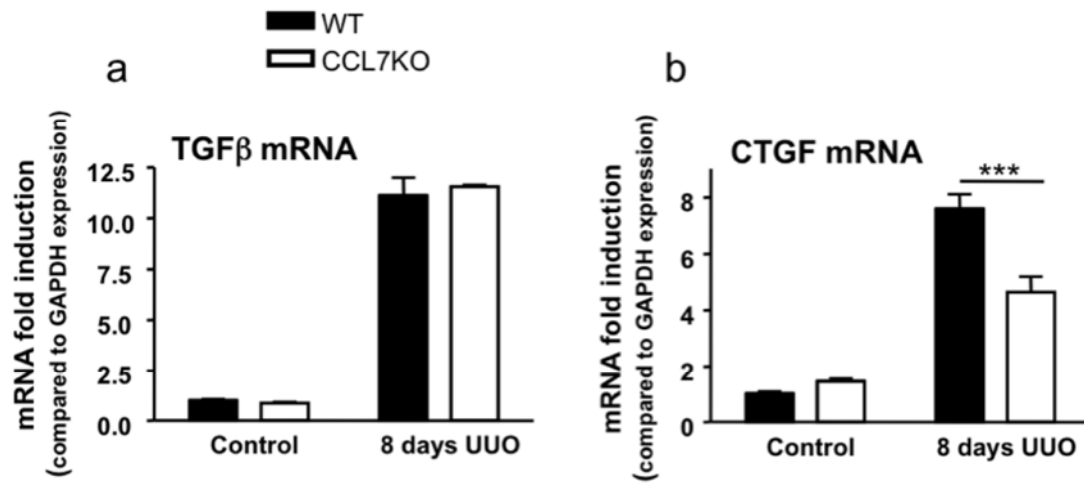
Gonzalez *et al.*

Figure 6



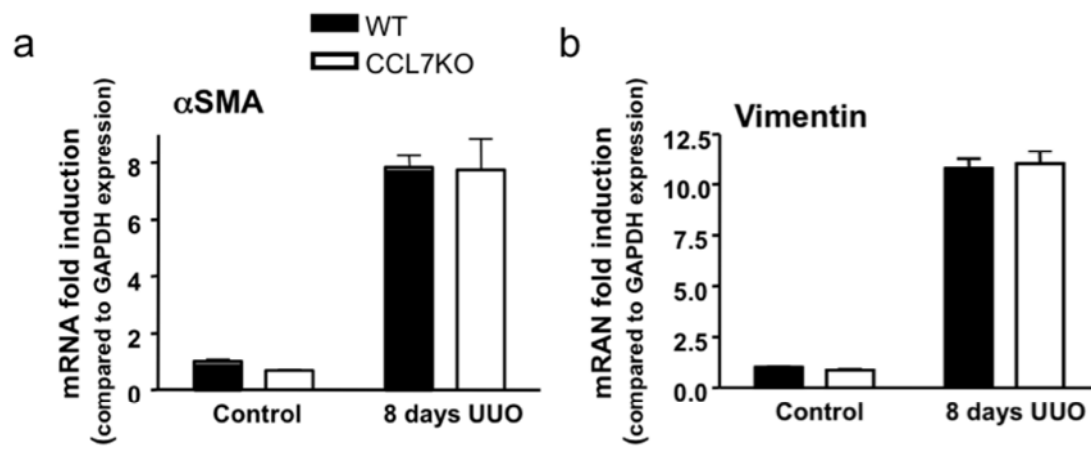
Gonzalez *et al.*

Figure 7



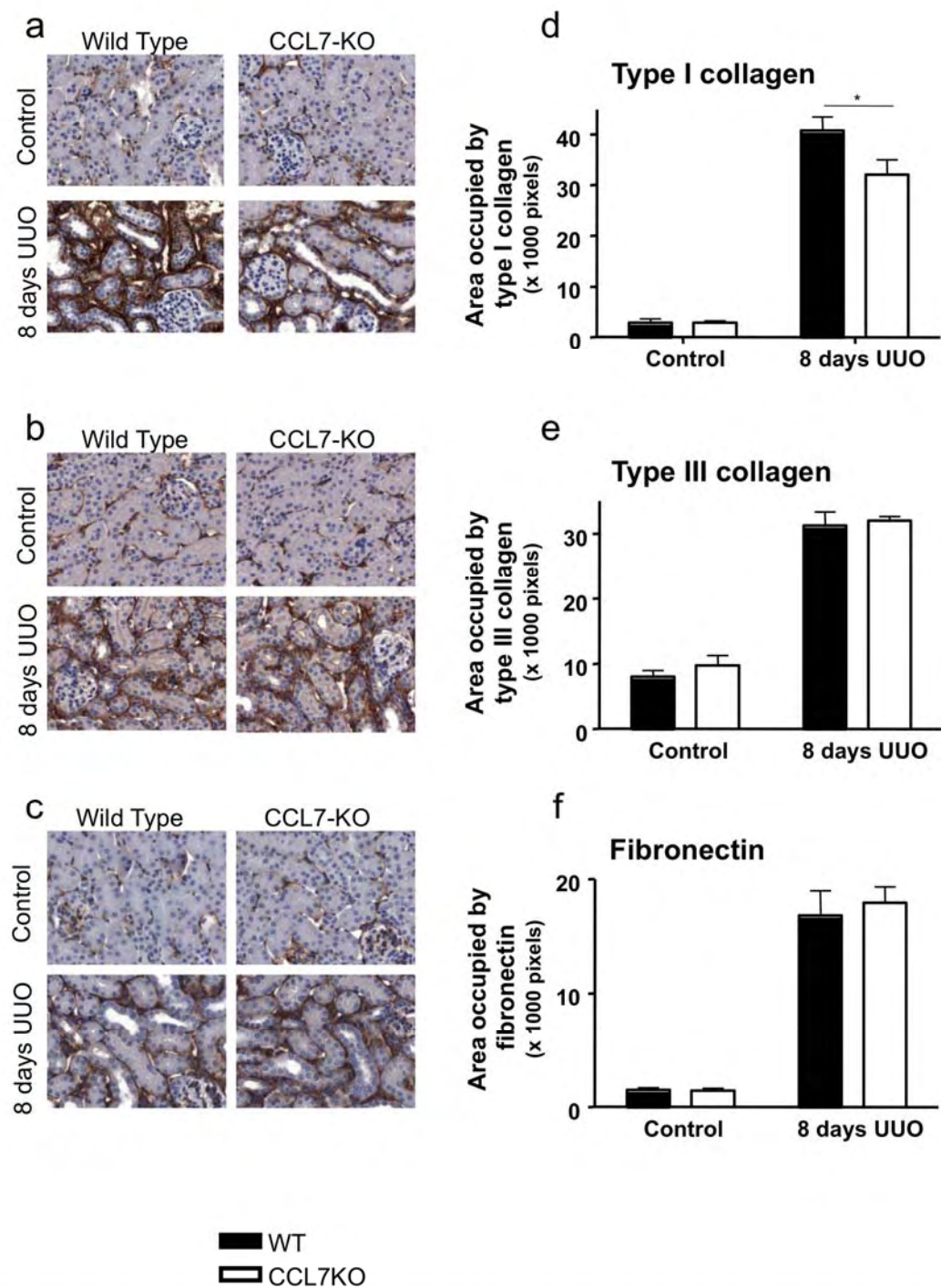
Gonzalez *et al.*

Figure 8



Gonzalez *et al.*

Figure 9



Gonzalez *et al.*

Figure 10

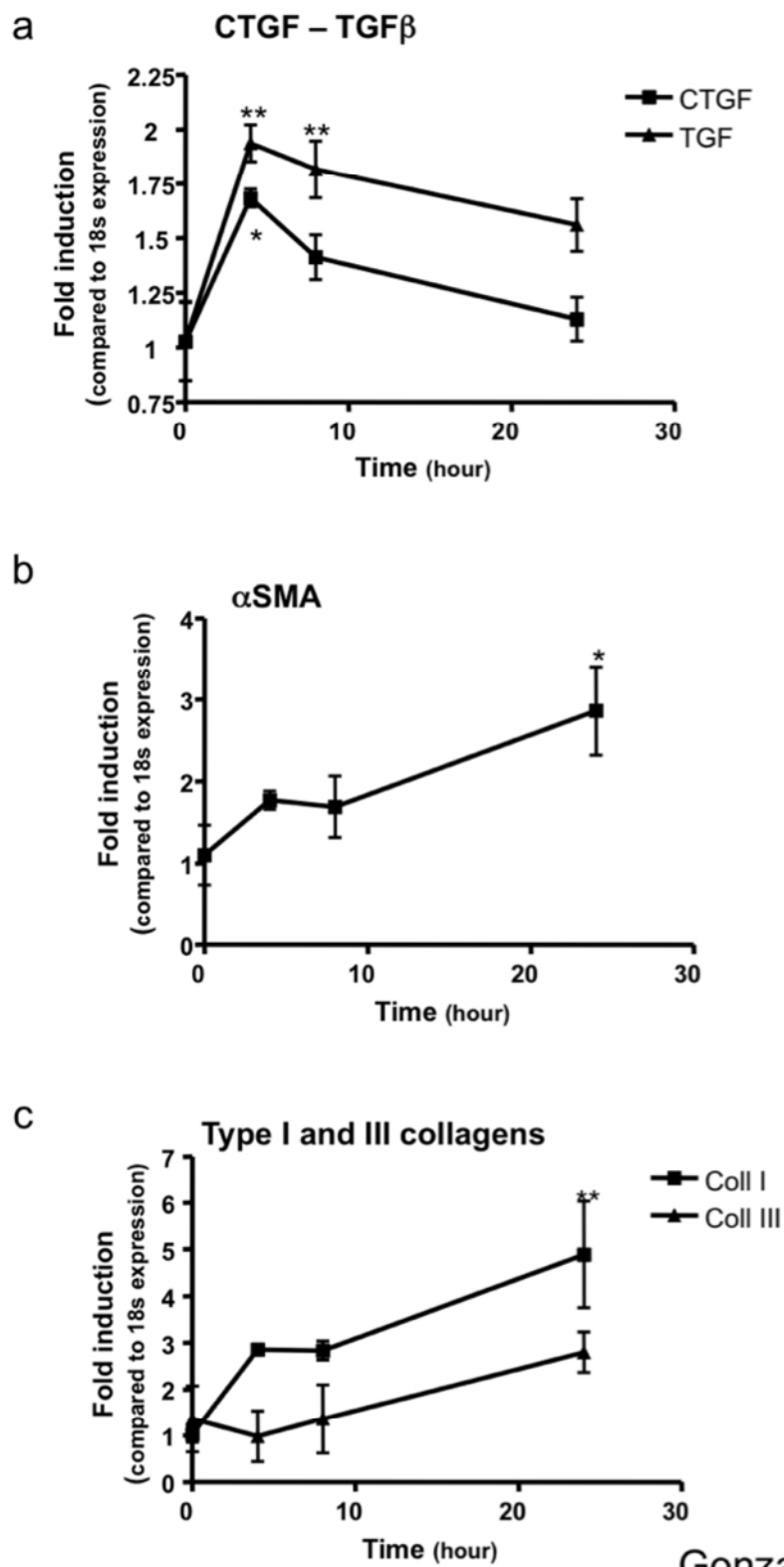
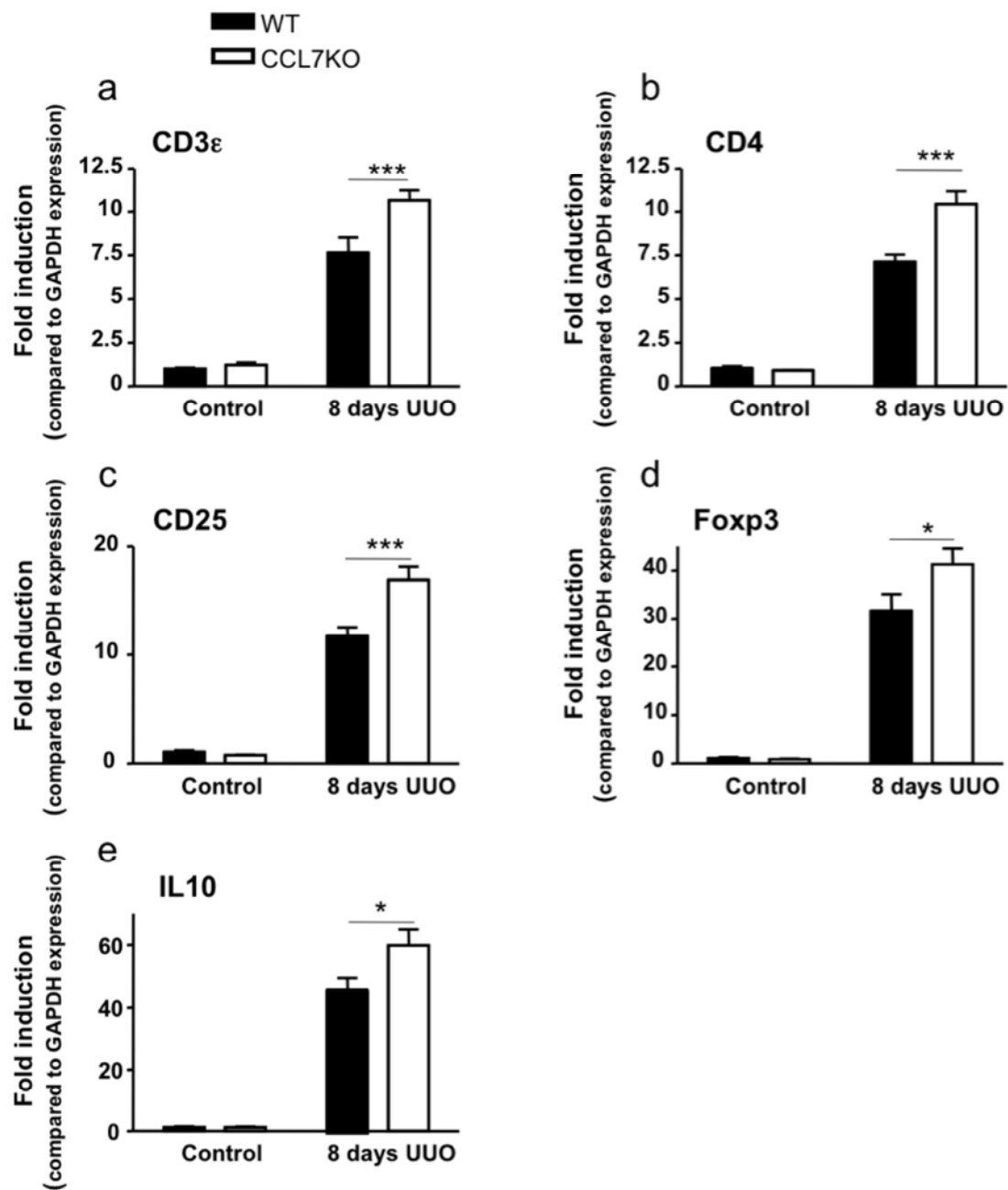


Figure 11



Gonzalez *et al.*

Autres résultats

"Bazinga !!!"

Dr. Sheldon Cooper, The Big Bang Theory
(la série, pas la vraie théorie...)

Le récepteur B1 de la Bradykinine dans les pathologies fibrosantes rénales

Depuis de nombreuses années, l'équipe s'intéresse au système des kinines. Après avoir montré les effets antifibrosants du récepteur B2 de la bradykinine (RB2) (370), l'équipe s'est attachée à mettre en évidence les rôles du RB1 dans le développement de la FTI. Les deux études suivantes se sont intéressées à l'effet bénéfique du blocage du récepteur B1 de la bradykinine dans différents modèles de néphropathies.

Nous avons vu que l'inflammation est à l'origine du développement de la fibrose. Atténuer ou bloquer ce phénomène inflammatoire semble être une bonne stratégie afin de contenir la FTI. Or, le RB1 est un récepteur très peu exprimé en conditions physiologiques et fortement induit en conditions inflammatoires. Ceci fait de lui une cible thérapeutique intéressante. Au laboratoire, nous disposons des animaux invalidés pour ce récepteur (B1^{-/-}) et d'un antagoniste non peptidique actif par voie orale, le SSR240612 (371). Ces outils nous ont permis d'évaluer les bénéfices obtenus suite au blocage génétique ou pharmacologique de ce récepteur dans les pathologies rénales.

1. Delayed blockade of the kinin B1 receptor induces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy (198)

Dans un premier travail, nous avons utilisé le modèle d'obstruction urétérale unilatérale (OUU) chez la souris comme modèle de fibrose tubulointerstitielle (FTI) rénale. Après induction de la pathologie, l'expression du RB1 augmente dans le rein obstrué en parallèle avec l'infiltrat macrophagique et cette surexpression est restreinte à cet organe là. Cette donnée permet de spéculer sur la diminution d'effets secondaires systémiques dus à l'administration d'un antagoniste du RB1.

Lors du blocage génétique (B1^{-/-}) ou pharmacologique (SSR240612), l'inflammation, l'apparition des myofibroblastes et l'accumulation de MEC sont fortement réduits après huit jours d'OUU. Le RB1 a donc un effet délétère dans le développement de la FTI. Cependant, dans cette approche le traitement antagoniste et l'inactivation génétique ont lieu avant l'induction de la pathologie, ce qui est très éloigné des pathologies humaines qui ne sont traitées qu'après installation de la pathologie. Afin de voir le potentiel thérapeutique du blocage du RB1, nous avons testé les effets de

l'antagoniste sur une fibrose déjà installée (3 jours d'OUU). De façon très intéressante, nous avons également observé une diminution de la FTI laissant penser que le blocage du RB1 pourrait être une stratégie efficace pour lutter contre la progression de la fibrose.

Le blocage du RB1 est associé à une diminution de l'expression des ARN messagers codant pour le CTGF et les chimiokines CCL2 et CCL7 mais reste sans effet sur le TGFβ. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* où la stimulation du RB1 par son agoniste naturel (DBK) conduit à l'augmentation d'expression de ces cytokines. Le RB1 participe donc à l'initiation de la phase inflammatoire par la synthèse des chimiokines CCL2 et CCL7 et à la production de MEC par la synthèse du CTGF.

Enfin, des expériences de transfert de moelle osseuse entre animaux sauvages et invalidés pour le RB1 permettent de prouver que le RB1 des cellules résidentes, et non pas celui des cellules infiltrantes, est responsable des effets décrits.

En conclusion, cette étude montre les rôles proinflammatoire et profibrosant du RB1 dans le développement de la FTI induite par OUU. La stimulation du RB1 des cellules résidentes conduit à l'expression de la cytokine profibrosante CTGF et des chimiokines CCL2 et CCL7. Ces médiateurs augmentent à la fois l'inflammation et la sécrétion de MEC. Ainsi le blocage du RB1 même sur une fibrose installée est bénéfique.

2. Blockade of the kinin B1 receptor ameliorates glomerulonephritis (199)

Sur les bases de l'étude précédente, nous nous sommes penchés sur une néphropathie plus chronique qu'est la glomérulonéphrite. Pour cela, un sérum immun néphrotoxique a été injecté à des souris. Deux semaines après induction de la pathologie, l'antagoniste SSR240612 a été administré quotidiennement par voie orale jusqu'à l'euthanasie des animaux à la sixième semaine.

Comme dans l'OUU, l'antagoniste administré sur une fibrose établie réduit fortement l'influx de macrophages et l'accumulation de MEC (ici le collagène de type III) et l'expression des ARNm des chimiokines CCL2, CCL5 et CCL7. Au niveau histologique, le blocage de RB1 fait chuter le nombre de croissants glomérulaires, de cylindres hyalins et de tubules atrophiés. Le traitement améliore également de façon importante la fonction rénale comme l'atteste la diminution de la créatininémie.

Ces résultats confirment ceux obtenus dans le modèle d'OUU, cependant il restait à démontrer l'intérêt d'un tel traitement chez l'Homme. Cela a été réalisé sur des biopsies de patients atteints de différentes néphropathies où le marquage histologique du RB1 est corrélé avec l'état inflammatoire du tissu.

Pour conclure sur ces études, nous avons montré que le blocage du RB1 pouvait être efficace pour bloquer ou ralentir la progression de la FTI issue de deux différents modèles de néphropathies. Nos résultats sur les biopsies humaines nous laissent penser que le RB1 pourrait devenir une cible thérapeutique dans le traitement des néphropathies.

Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy

J. Klein,^{*,†,1} J. Gonzalez,^{*,†,1} J. Duchene,^{*,†} L. Esposito,[§] J. P. Pradère,^{*,†} E. Neau,^{*,†} C. Delage,^{*,†} D. Calise,^{||} A. Ahluwalia,^{||} P. Carayon,^{||} J. B. Pesquero,[§] M. Bader,^{*,†} J. P. Schanstra,^{*,†,2} and J. L. Bascands^{*,†,2}

^{*}INSERM, Department of Renal and Cardiac Remodeling-Team 5, Toulouse, France; [†]Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ^{||}William Harvey Research Institute, Barts, and the London Medical School, London, UK; [§]Nephrology and Kidney Transplantation Department, CHU Rangueil, Toulouse University Hospital, Toulouse, France; ^{||}INSERM, Zootechny Department of Experimental Micro-Surgery, Toulouse, France; [§]Sanofi-Aventis R&D, Montpellier, France; [†]Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, Brazil; and ^{**}Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany

ABSTRACT Renal fibrosis is the common histological feature of advanced glomerular and tubulointerstitial disease leading to end-stage renal disease (ESRD). However, specific antifibrotic therapies to slow down the evolution to ESRD are still absent. Because persistent inflammation is a key event in the development of fibrosis, we hypothesized that the proinflammatory kinin B1 receptor (B1R) could be such a new target. Here we show that, in the unilateral ureteral obstruction model of renal fibrosis, the B1R is overexpressed and that delayed treatment with an orally active non-peptide B1R antagonist blocks macrophage infiltration, leading to a reversal of the level of renal fibrosis. *In vivo* bone marrow transplantation studies as well as *in vitro* studies on renal cells show that part of this antifibrotic mechanism of B1R blockade involves a direct effect on resident renal cells by inhibiting chemokine CCL2 and CCL7 expression. These findings suggest that blocking the B1R is a promising antifibrotic therapy.—Klein, J., Gonzalez, J., Duchene, J., Esposito, L., Pradère, J. P., Neau, E., Delage, C., Calise, D., Ahluwalia, A., Carayon, P., Pesquero, J. B., Bader, M., Schanstra, J. P., Bascands, J. L. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J.* 23, 134–142 (2009)

Key Words: kidney disease • bradykinin • unilateral ureteral obstruction • chemokine • reversal

THE INCIDENCE OF CHRONIC KIDNEY DISEASE (CKD) leading to end-stage renal disease (ESRD) has significantly increased and may reach epidemic proportions over the next decade (1). Regardless of the initial insult, the progression of most forms of renal disease results in tubulointerstitial fibrosis, which is the main histological hallmark of CKD (2). The presence of fibrosis in CKD is closely correlated to the future appearance of renal failure and has therefore been associated with poor long-term prognosis (3). Interstitial fibrosis is characterized by the progressive accumulation of extracellular

matrix (ECM) proteins in the tubulointerstitial compartment. A multitude of events and factors (4) were identified to be involved in the development of renal fibrosis, potentially leading to new antifibrotic strategies and compounds (5–7). However, in humans blockade of the renin-angiotensin aldosterone system remains the only effective therapy (1). These therapies only slow down the progression toward ESRD, and alternative molecules or therapies are still necessary.

As a general rule, the acute inflammatory response protects against infection and injury; however, the chronicity of inflammation is often deleterious (8). Chronic inflammation is a key event in CKD that is mainly characterized by monocyte/macrophage accumulation in the renal interstitium and is well correlated with the progression of CKD (9, 10). Consequently, any strategy or agent able to limit or attenuate chronic renal inflammation should significantly slow down the rate of progression of CKD.

Lys-bradykinin and Lys-des-Arg²-bradykinin are peptides intimately linked to inflammation (11). These kinin peptides interact with 2 different G-protein-coupled receptors: the kinin B2 receptor (B2R) and the B1 receptor (B1R), respectively (11). Constitutively expressed in most tissues, the B2R has been shown to mediate most of the physiological actions of kinins. The role of the B2R has been studied in experimental CKD. We and others have observed that blockade of the B2R increased experimental renal fibrosis (12–15), but the ubiquitous expression of the B2R does not make it an ideal target.

In contrast, the kinin B1R, which is hardly detectable under physiological conditions, is overexpressed under inflammatory conditions in a variety of different tissues

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: INSERM, Department of Renal and Cardiac Remodeling-Team 5, 1 av Jean-Poulhès, 31432 Toulouse, France. E-mail: J.L.B., jean-loup.bascands@inserm.fr; J.P.S., joost-peter.schanstra@inserm.fr
doi: 10.1096/fj.08-115600

(11) and in turn stimulates inflammation on activation. These data suggest that the B1R might be a more suitable target in chronic inflammatory renal disease.

A large number of *in vitro* and *in vivo* studies have shown that B1R induction is controlled by many proinflammatory cytokines and growth factors, including interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , and interferon gamma, as well as epidermal growth factor (11). There is now clear evidence that induction of the B1R by many of these factors involves activation of transcription factor NF- κ B, and, conversely, B1R stimulation activates NF- κ B (11, 16). The activated B1R stimulates release of TNF- α and IL-1 (17) and is also involved in leukocyte accumulation and activation (18, 19). The B1R is known to be expressed on macrophages and on fibroblasts *in vitro* (20). Furthermore we have previously shown *in vivo* that experimental inflammation induces functional B1R expression in renal epithelial cells (16, 21). Its role in acute renal disease (ischemia-reperfusion) has been studied but yielded contradictory results most probably due to compensation in the genetically engineered B1R, B2R single and B1R/B2R double knockout mice (22, 23). However, to the best of our knowledge, the role of the B1R in chronic renal inflammation and fibrosis has never been studied.

Taken together, specific induction of the B1R in renal inflamed tissues, its role in inflammation, and the role of chronic inflammation in renal fibrosis led us to hypothesize that blocking the B1R could be an efficient approach to control the progression of CKD.

MATERIALS AND METHODS

Drug

B1R antagonist SSR240612 was synthesized at Sanofi-Aventis R&D Montpellier-France (24). For *in vivo* experiments, this compound was dissolved in water containing 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a 1 g/L solution. The SSR240612 solution was diluted with distilled water and administered by gavage at a dose of 10 mg/kg/d. Final DMSO concentration was 0.01%.

Animals

Mice invalidated for the B1R (B1 $^{-/-}$) were obtained as described previously (25). Briefly, mice were generated by gene targeting on a mixed genetic background (129/SvJ \times C57Bl/6J) and backcrossed 10 times to C57Bl/6J (Harlan), as previously reported (26). We used C57Bl/6J (Harlan) as their wild-type (B1 $^{+/+}$) control littermates. The mice were housed in a pathogen-free environment. All experiments reported were conducted in accordance with the NIH guide for the care and use of laboratory animals and were approved by a local animal care and use committee.

Unilateral ureteral obstruction (UO)

B1 $^{+/+}$ and B1 $^{-/-}$ male mice of 8 wk of age were used for these experiments. The unilateral ureteral ligation was performed as described previously (12). Briefly, under oxygen-isoflurane anesthesia and through a longitudinal, left abdominal incision, the ureter was exposed and ligated

with a 6/0 nylon thread at the uretero-pelvic junction. In sham operations, the ureter was exposed but not ligated and repositioned. Mice were maintained on standard mouse chow and tap water. Treatments with the B1R antagonist were initiated either 1 d before obstruction or 3 d after and continued throughout the time of obstruction. A control group received only the vehicle (0.01% DMSO solution). At the end of the different protocols, mice were sacrificed, and the kidneys were removed and divided in different parts according to the different protocols employed.

Cell culture

HEK293T (human embryonic kidney) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) without pyruvate and with 4.5 g/L glucose and 10% fetal calf serum at 37°C, 5% CO $_2$. Cells were seeded in 6-well plates and were transiently transfected with either a pcDNA3 plasmid containing the GFP gene (green fluorescent protein, pGFP) or a pcDNA3 plasmid containing the gene encoding for the human B1R (phB1R) (BDKB10TN00; Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA) using JetPEI transfection reagent (Ozyme, St. Quentin Yvelines, France). Two days later, cells were pretreated or not with the peptidic antagonist des-Arg 10 ,Leu 9 kallidin (10 $^{-6}$ M) (NeoMPS, Strasbourg, France) for 15 min and then treated with the human B1R agonist des-Arg 10 kallidin (10 $^{-6}$ M) (NeoMPS) for 4 h.

Bone marrow transplantation

Bone marrow transplantation was performed as described previously (27). Briefly, 8-wk-old B1 $^{+/+}$ male recipient mice were lethally irradiated with 10 Gy and given acidified water (pH 2) with antibiotics (100 mg/L neomycin and 60,000 U/L polymyxin B sulfate; Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) until 4 wk after the transfer. Bone marrow cells were isolated from femurs and tibiae of 12-wk-old B1 $^{+/+}$ or B1 $^{-/-}$ donor mice by flushing with PBS. Cells were then passed through a 21-gauge needle, centrifuged (250 g, 5 min, 4°C), and resuspended in RPMI 1640 (Invitrogen), 2% fetal calf serum, and 5 U/mL heparin. Recipient mice received 5×10^6 bone marrow cells in 100 μ L by tail-vein injection. UO was performed 4 wk after transplantation. At the time of sacrifice, peritoneal macrophages were isolated from the abdominal cavity by peritoneal lavage, and blood was harvested. Hematologic analysis was performed by counting red blood cells, platelets, total leukocytes, neutrophils, monocytes, and lymphocytes using a Micros-60CS/18 automated counter (ABX-Diagnostics, Montpellier, France). The genomic DNA was extracted, and the genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR) to verify the reconstitution of bone marrow after transplantation.

Histological analysis and immunohistochemistry

Four-micrometer paraffin-embedded sections were cut and used for routine staining (hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff staining) and immunohistochemistry. Sections were first dewaxed in toluene and rehydrated through a series of graded ethanol washes before endogenous peroxidase blockage. Specific primary antibodies were incubated (1 h at room temperature) for the detection of collagen type III (1/500) (Interchim, Montluçon, France), of F4/80 positive inflammatory cells (macrophages) (anti-mouse F4/80, 1/250) (RM2900; Caltag Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and α -smooth muscle actin (α -SMA, Dako Epos method, U7033; Dako S.A., Trappes, France). For

visualization, we used the Dako Envision system. Sections were finally counterstained with hematoxylin. Negative controls for the immunohistochemical procedures included substitution of the primary antibody with nonimmune sera.

Histomorphometric analyses were performed as described previously (12) using a commercially available image-analysis software, which allows rebuilding of a kidney section from adjacent individual captures (Explora Nova Mosaic software, La Rochelle, France).

Isolation of RNA

Total RNA was isolated from mouse tissue or cells using Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), eluted in 20 μ l RNase-free water and treated by DNase (Turbo DNA-free kit; Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's protocol. We used 1.5 μ l of this solution for quantitation by a NanoDrop instrument (ND-1000 spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Quantification of gene expression by real-time quantitative PCR

Real-time PCR was performed using the ABI Prism7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR amplification was performed in a total volume of 25 μ l containing 25 ng of cDNA sample, 300 nM of forward and reverse primer, and 12.5 μ l of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reaction mixture was preheated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. In our experimental models, the most stable mouse housekeeping gene was the 18S ribosomal RNA (18S). The primers used in this study are listed in Table 1.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD. ANOVA with *post hoc* Tukey alpha test was performed for comparison between the different groups. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Renal B1R expression is induced in mice during UUO

We have used the *in vivo* model of UUO-induced renal fibrosis. This model has the advantage to mimic, in an accelerated manner, the main stages leading to interstitial fibrosis: macrophage infiltration, myofibroblast appearance, and ECM accumulation (28). Mice were subjected to UUO, and kidneys were harvested at different time points after obstruction (Fig. 1). Macrophage infiltration was quantified by immunohistological staining for F4/80, and B1R mRNA expression was analyzed by real-time PCR. F4/80-positive cell infiltration started 24 h after UUO, and their number clearly increased all along the progression of the pathology (Fig. 1A). Twenty-four hours of UUO induced a slight increase in B1R mRNA expression, which became significant at days 3 and 8 (Fig. 1B). This induction was restricted to the obstructed kidney because UUO did not induce B1R mRNA expression in the contralateral kidney or in other tissue, including aorta, brain, mesenteric tissue, or lung (Fig. 1C).

Genetic and pharmacological blockade of the B1R reduces significantly the development of UUO-induced renal fibrosis

We next assessed the effect of B1R blockade on the development of renal fibrosis. Interstitial collagen accumulation was studied by histomorphometric analysis in Sirius red-stained renal sections as an index of the fibrotic response to UUO of B1^{-/-}, B1^{+/+}, and mice pretreated with a B1R antagonist (B1Ra, 10 mg/kg/d) (Fig. 2A, B). After 8 d of UUO, interstitial fibrosis was

TABLE 1. Primer sequences used for real-time PCR

Gene	Name	GenBank accession no.	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
Human				
CTGF	Connective tissue growth factor	NM_01901	CAGCATGGAGGTTGGTCTG	CCAACCACGGTTTGGTCCTT
CCL2	Chemokine (CC motif) ligand 2, MCP1	NM_002982	CCCAGTCACCTGCTGTTAT	AGATCTCCTTGGCCACAATG
CCL7	Chemokine (CC motif) ligand 7, MCP3	NM_006273	ACCACCAGTAGCCACTGTCC	GTCTCTGGACCCACTTCTGTG
Mouse				
B1R	Bradykinin receptor 1	NM_007539	TGGAGTTGAACGTTTTGGCTTT	GTGAGGATCAGCCCCATTGT
Coll 1	Collagen 1	NM_007742	TGTGTCCGATGACGTGCAAT	GGGTCCCTCGACTCCTACA
Coll 3	Collagen 3	NM_009930	ACGTAGATGAATTGGGATGCAG	GGGTTGGGCAGTCTAGTG
Coll 4	Collagen 4	NM_009931	CCGGGATTTACTGGACCACC	CCCTTGCTCTCCCTTGTC
CCL2	Chemokine (CC motif) ligand 2, MCP1	NM_011333	TCTTTGGGACACCTGCTGCTG	AGCCAGCACCAGCACCAGCC
CCL7	Chemokine (CC motif) ligand 7, MCP3	NM_013654	TGAAGAAATGTGCCTGAACAGAA	CGTGATCAACACATTTTCATCAACA
CTGF	Connective tissue growth factor	NM_010217	GGCATCTCCACCCGAGTTAC	GATTTTAGGTGTCCGGATGCA
TGF β 1	Transforming growth factor beta 1	NM_0011577	TCGACATGGAGCTGGTGAAA	GGGACTGGCGAGCCTTAGTT
Human/mouse				
18S	Ribosomal RNA 18S	NR_003286	AGCCTGCGGCTTAATTTGAC	CAACTAAGAACGGCCATGCA

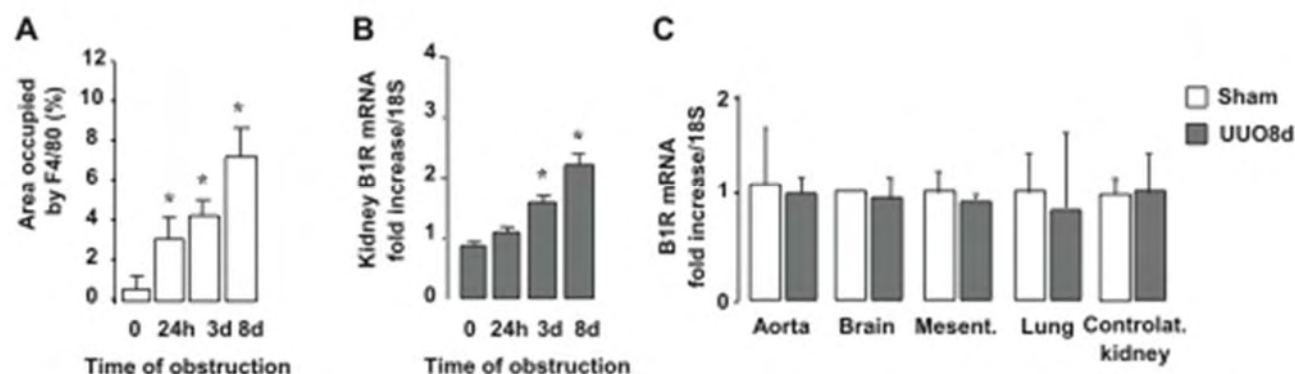


Figure 1. B1R mRNA expression is induced locally in the kidney by UO. Kinetics of macrophage infiltration was quantified by immunohistological staining for F4/80 (A), and B1R mRNA expression was analyzed by real-time PCR expression during UO (B). B1R mRNA expression was quantified by real-time PCR in aorta, brain, mesenteric tissue, lung, and contralateral kidney of mice submitted to 8 d UO (gray bars) compared to sham operated mice (white bars) (C). * $P < 0.05$ vs. time 0. $n = 10$ /group.

significantly reduced in $B1^{-/-}$ (Fig. 2A) and mice pretreated with the B1Ra (Fig. 2B) compared to the $B1^{+/+}$ group or wild-type mice treated with the vehicle only. In the different control groups (sham) no significant difference in interstitial fibrosis was observed.

B1R blockade decreases inflammatory cell infiltration and myofibroblast appearance

In the tubulointerstitium of the control groups (sham) of both $B1^{+/+}$ and $B1^{-/-}$ we found a very low level of F4/80 positive macrophages (Fig. 2C, D) and α -SMA positive myofibroblasts (Fig. 2E, F). As expected, UO induced a significant increase in these renal fibrosis markers. Very interestingly, this increase was prevented by the genetic and pharmacological blockade of the B1R (Fig. 2C, F).

Delayed B1R antagonist treatment blunts the development of UO-induced renal fibrosis

To more closely mimic the clinical situation, we investigated whether B1R blockade would result in improvement of established renal fibrosis and inflammation. We thus studied the effect of delayed B1R blockade on UO-induced fibrosis. Three days of UO resulted in significant B1R expression (Fig. 1B), and kidney sections were also already strongly positive for macrophages, myofibroblasts, and collagen accumulation (Fig. 3A, black line). We therefore decided to start B1Ra treatment 3 d after UO (Fig. 3A, arrow). B1Ra halted F4/80 positive macrophage infiltration, and this was associated with a significant decrease in interstitial myofibroblasts and fibrosis (Fig. 3A, blue line). This effect was confirmed at the mRNA level because we found a significant decrease in collagen type I, III, and IV mRNA expression (Fig. 3B). Treatment with B1Ra did not alter B2R mRNA expression (not shown).

Delayed B1R antagonist treatment blunts connective tissue growth factor (CTGF), chemokine (CC motif) ligand (CCL) 2, and CCL7 mRNA expression

To better understand the mechanism by which B1R blockade is reducing renal fibrosis, we analyzed mRNA

expression of the profibrotic cytokines transforming growth factor (TGF)- β and CTGF, and 2 chemokines shown to be critical for monocyte/macrophage recruitment, CCL2 [monocyte chemoattractant protein (MCP)-1] and CCL7 (MCP-3) (29, 30). As shown in Fig. 4, the UO-induced expression of CTGF, CCL2, and CCL7 was blunted by delayed oral B1Ra administration. However, the treatment did not significantly affect TGF- β .

Activation of the B1R directly induces CTGF, CCL2, and CCL7 mRNA expression *in vitro*

To investigate whether the B1R is able to directly stimulate cytokine and chemokine expression, we used a B1R-transfected HEK293 cell line, which is a classical cellular model commonly used to evaluate the effects of the B1R (24, 31). We analyzed expression of CCL2, CCL7, and CTGF in these cells transfected with a GFP-containing plasmid, pGFP, as a control, or a human B1R-containing plasmid, pH1R (Fig. 5). Cells were treated either with the human B1R agonist, des-Arg¹⁰ kallidin (1 μ M), or the peptidic B1R antagonist, des-Arg¹⁰,Leu⁹ kallidin (1 μ M). Treatments with either B1R agonist or -antagonist alone were without effect on chemokine expression in control GFP-transfected cells. In B1R-overexpressing cells, the B1R agonist induced rapid expression (4 h) of CCL2, CCL7, and CTGF, and this effect was blunted by B1Ra treatment. No effect was observed on TGF- β expression (not shown).

Specific deletion of the B1R on blood circulating cells does not affect the development of UO-induced fibrosis

As the B1R is expressed on infiltrating macrophages as well as on resident renal cells in the inflamed kidney, we investigated whether specific B1R knockout on blood circulating cells (including inflammatory cells) modifies the development of UO-induced fibrosis in $B1^{+/+}$ mice. To verify that the mice were successfully reconstituted with bone marrow, peritoneal macrophages and blood of the recipient mice were harvested before the sacrifice,

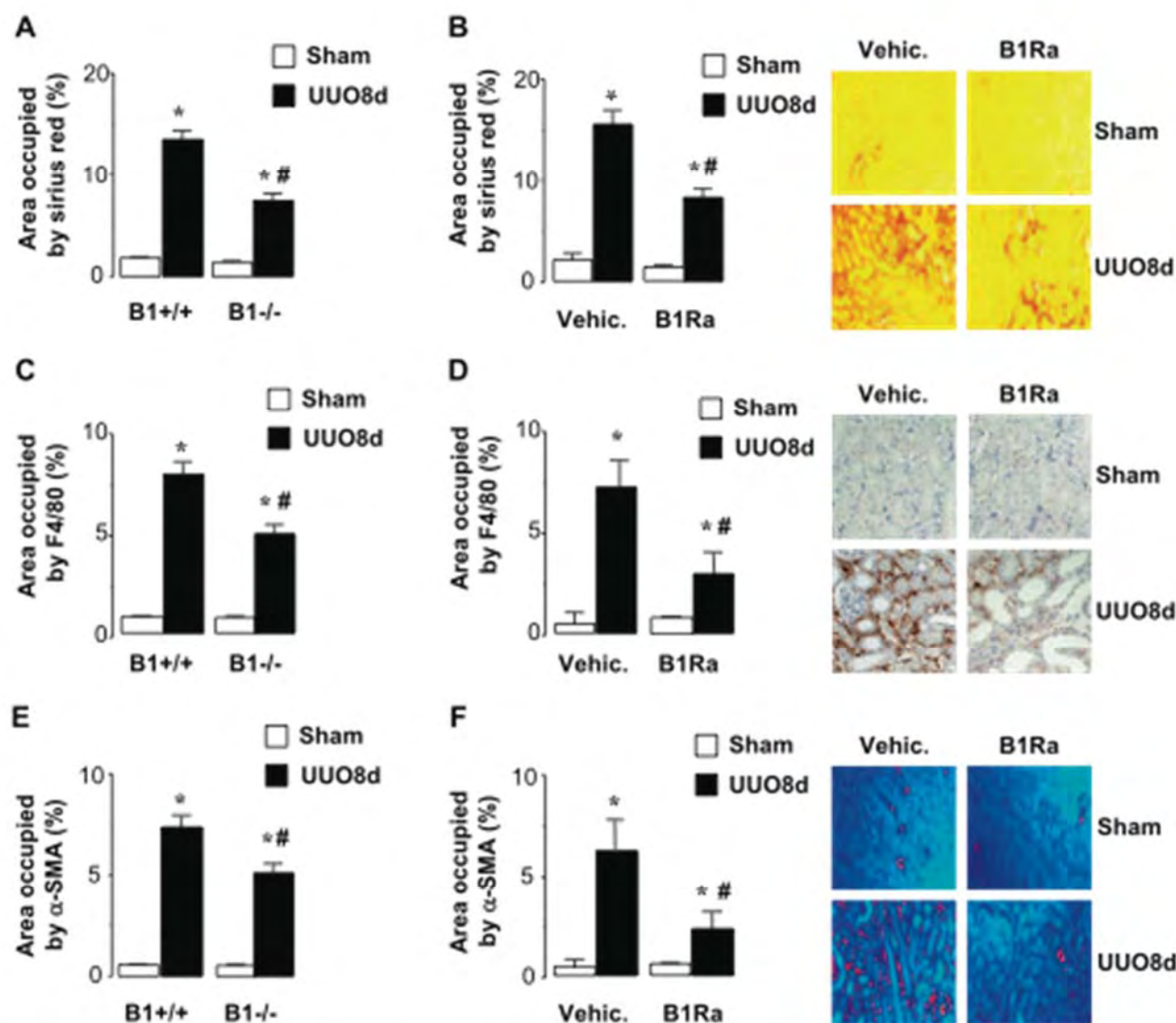


Figure 2. Genetic and pharmacological blockade of the BIR reduces UO-induced renal inflammation and fibrosis. The effect of BIR knockout (B1^{-/-}) (A, C, E) or BIR antagonist (B1Ra) treatment (B, D, F) after 8 d UO was assessed by comparison to wild-type mice (B1^{+/+}) or vehicle-treated mice, respectively. Collagen accumulation was quantified by Sirius red staining (A, B), macrophage infiltration by anti-F4/80 immunohistochemistry (C, D), and myofibroblast appearance by anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) immunohistochemistry (E, F). Pictures display representative areas of kidneys from vehicle-treated or B1Ra-treated, sham, or obstructed mice. **P* < 0.05 vs. sham. #*P* < 0.05 vs. UUO 8 d. *n* = 10/group.

counted, and genotyped. As shown in Fig. 6A, no difference was observed in the number of circulating hematopoietic cells in wild-type mice with B1^{+/+} or B1^{-/-} marrow. Moreover, in wild-type mice reconstituted with B1^{-/-} marrow, the BIR mRNA corresponding band was not detected in the blood as well as in peritoneal macrophages (Fig. 6B). These results demonstrated that the mice were successfully reconstituted and that blood circulating cells were primarily from the donor. B1^{-/-} bone marrow (B1^{-/-}Bm)-transplanted wild-type mice subjected to 8 d UO did not display significant differences in chemokine mRNA expression (CCL2, CCL7), macrophage infiltration (F4/80 immunohistochemistry), and fibrosis development (Sirius red) compared to obstructed B1^{+/+}Bm-transplanted mice (Fig. 6C). These results strongly support the hypothesis that the effect of BIR blockade on interstitial fibrosis is mainly mediated by

resident renal cells, most likely by reducing chemokine expression and subsequently reduced inflammatory cell recruitment.

DISCUSSION

The main characteristics of most forms of CKD are persistent inflammation and tubulointerstitial fibrosis, which are strong prognostic factors for progression toward ESRD (2, 3, 32). As recently reviewed (33), chronic inflammation is one of the novel risk factors contributing to the increased mortality seen in CKD patients. Therefore, it is hypothesized that reduction of renal interstitial inflammation has the potential to reduce the progression of interstitial fibrosis and thus prevent ESRD (7, 34). To the best of our

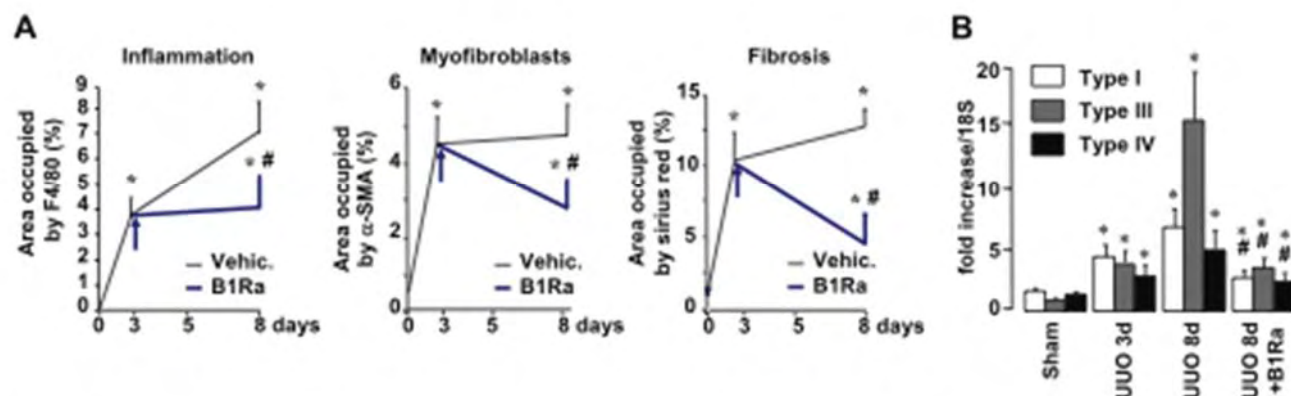


Figure 3. UO-induced renal inflammation and fibrosis are reduced with delayed B1R antagonist treatment. **A)** Mice were subjected to UO for 8 d (black line), while oral B1R antagonist (B1Ra) treatment started 3 d after the obstruction (arrow, blue line). Kidney sections were analyzed by immunohistological staining for macrophages (F4/80), myofibroblasts (α -SMA), and collagen (Sirius red) accumulation. **B)** Type I, III, and IV collagen mRNA expression was analyzed by real-time PCR. * $P < 0.05$ vs. sham-operated mice. # $P < 0.05$ vs. UO 8 d vehicle-treated mice. $n = 10$ /group.

knowledge, even if a number of promising strategies are emerging (7, 34), we still do not have effective therapeutic strategies or molecules able to specifically target and reduce chronic renal inflammation without blocking other important pathophysiological functions.

We present here data that support the hypothesis that specific blockade of the kinin B1R might be a promising strategy to reduce renal chronic inflammation and subsequently blunt the development of renal fibrosis. Several lines of evidence support this hypothesis. We first demonstrated that the B1R contributed to the progression of UO-induced renal inflammation and fibrosis. We next showed that delayed treatment with an orally active nonpeptide B1R antagonist in the UO model significantly decreased the progression of established renal fibrosis. We further showed, using the UO model associated with bone marrow transplantation experiments and *in vitro* studies, that this effect was partly mediated *via* a mechanism involving the inhibition of CTGF and chemokine expression by resident renal cells. To our knowledge this is the first *in vivo* study reporting that B1R blockade could become an efficient antifibrotic strategy.

We first demonstrated that during UO, B1R mRNA expression was significantly increased in the obstructed kidney. Very interestingly, this induction seemed to be restricted to the site of the pathology, because there was no marked difference of B1R expression in other tissues. The effects of genetic ablation of the B1R ($B1^{-/-}$) showed reduced macrophage recruitment associated with a reduction in interstitial fibrosis. This suggests that B1R blockade is modifying the inflammatory response. This was consistent with the attenuated inflammatory response observed in $B1^{-/-}$ mice in different inflammatory models, including pleurisy and paw edema (25), as well as in a model of intestinal ischemia and reperfusion injury (35).

It is well known that compensatory mechanisms occur in genetically engineered animals. We have previously reported increased renal B1R expression in $B2^{-/-}$ mice (36). Similarly, increased renal B2R mRNA expression in $B1^{-/-}$ mice has been reported (37). We have also shown that *in vivo* B2R activation reduces UO-induced renal fibrosis (12). Therefore, it is possible that the B2R is involved in the effects observed in $B1^{-/-}$ mice. However, B1R antagonist treatment, mim-

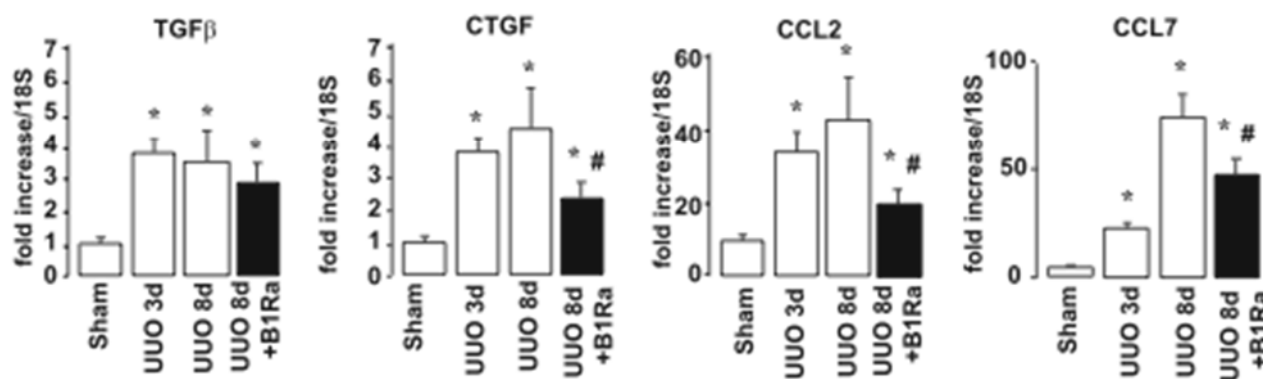


Figure 4. Delayed administration of B1R antagonist blunts UO-induced chemokine and cytokine overexpression. We analyzed mRNA expression of the profibrotic cytokines (TGF- β , CTGF) and chemokines (CCL2, CCL7) by real-time PCR during UO in vehicle-treated mice (open bars) or in B1R antagonist (B1Ra) treated mice (filled bars). * $P < 0.05$ vs. sham-operated mice. # $P < 0.05$ vs. UO 8 d vehicle-treated mice. $n = 10$ /group.

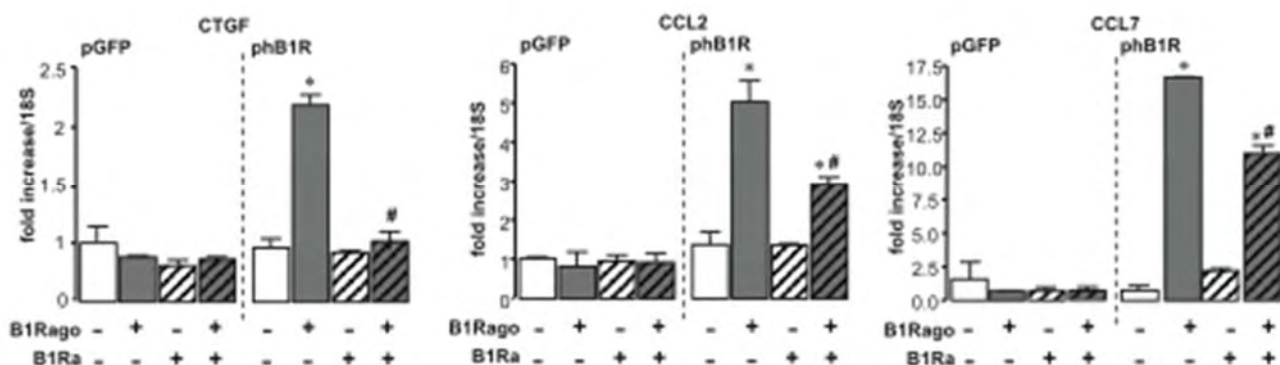


Figure 5. B1R stimulation induces CCL2, CCL7, and CTGF overexpression in HEK293 cells. CCL2, CCL7, and CTGF mRNA expression analysis by real-time PCR in HEK293T cells transfected with GFP (pGFP) or human B1 receptor (phB1R). Cells were pretreated with B1R antagonist (B1Ra) (des-Arg¹⁰,Leu⁹ kallidin, 10^{-6} M) for 15 min and then treated with B1R agonist (B1R ago) (des-Arg¹⁰ kallidin, 10^{-6} M) for 4 h. * $P < 0.05$ vs. unstimulated cells. # $P < 0.05$ vs. B1R agonist alone. $n = 3$.

icking the effects observed in B1^{-/-} mice, did not induce renal B2R mRNA expression. Thus, the reduction in UUO-induced renal fibrosis observed in B1^{-/-} mice is most likely not due to the modification of kinin B2R expression.

How does B1R blockade reduce the inflammatory response in this model of renal fibrosis? As shown by a number of studies, interstitial inflammation mediated by macrophages constitutes an early and major event in response to UUO (38, 39). The precise molecular mechanism of the development of renal fibrosis is not yet fully elucidated, but key mediators, including the major profibrotic cytokines TGF- β and CTGF, were clearly identified (4, 28, 40, 41). As expected, we observed an increased TGF- β and CTGF mRNA expres-

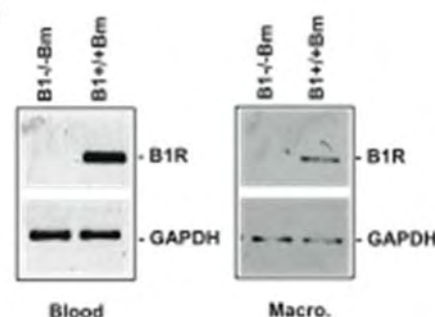
sion in UUO-induced fibrosis. Interestingly, the blockade of the B1R was not associated with a decrease in TGF- β mRNA expression but reduced its downstream mediator CTGF. This observation confirms *in vitro* experiments reporting that activation of the B1R stabilized CTGF mRNA, without modifying TGF- β expression (20). In addition, this is the first demonstration that B1R antagonism reduces CTGF mRNA expression *in vivo*. Furthermore a number of chemokines are involved in renal monocyte/macrophage infiltration (9). The role of CCL2 (MCP-1) (30) and even more recently the role of CCL7 (MCP-3) (29) was clearly established in this process. Our data showed reduced renal expression of these 2 chemokines in response to B1Ra treatment.

A

Bone marrow	n	WBC (μ L)	RBC ($\times 10^6/\mu$ L)	PLT ($\times 10^3/\mu$ L)	Monocyte (% of WBC)	Lymphocyte (% of WBC)	Neutrophil (% of WBC)
B1 ^{+/+}	9	7188 \pm 410	881 \pm 93	265 \pm 114	17 \pm 5	72 \pm 7	12 \pm 4
B1 ^{-/-}	12	7766 \pm 427	819 \pm 64	363 \pm 154	16 \pm 3	72 \pm 8	11 \pm 6

WBC: white blood cells; RBC: red blood cells; PLT: platelets

B



C

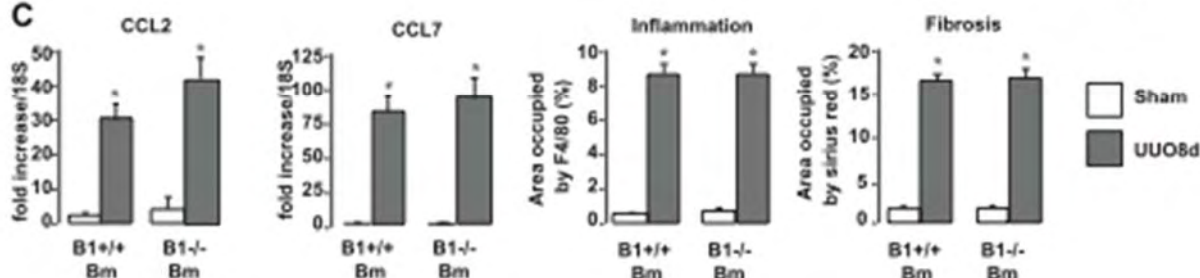


Figure 6. Absence of B1R in bone marrow-derived cells does not affect the development of fibrosis during UUO in wild-type mice. The successful reconstitution of wild-type mice with either wild-type (B1^{+/+}) or B1 knockout (B1^{-/-}) bone marrow was confirmed by counting the number of circulating hematopoietic cells (A) and by genotyping blood cells (B, top panel) and peritoneal macrophages using PCR (B, bottom panel). The effect of 8 d UUO in wild-type mice with either B1^{+/+} or B1^{-/-} bone marrow (Bm) transplantation was assessed by measurement of CCL2 and CCL7 mRNA levels and by immunohistological staining for F4/80 and collagen (Sirius red). * $P < 0.05$ vs. sham-operated mice (white bar). $n = 7$ /group.


The next issue was to determine whether the B1R is directly involved in this attenuated chemokine response observed *in vivo*. To verify this hypothesis we used HEK cells transfected with the human B1R to study the effect of B1R stimulation on CTGF and chemokine expression. We observed that B1R stimulation is able to rapidly (4 h) induce a significant increase in CTGF, CCL2, and CCL7 mRNA expression, which was abolished by a specific B1R antagonist. Although the mechanism by which the B1R stimulates CTGF mRNA overexpression has been previously shown to be mediated by mRNA stabilization (20), the effects of B1R activation on CCL2 and CCL7 mRNA expression most probably involves NF- κ B, as it was shown that the B1R activates this transcription factor (42). In addition, down-regulation of CCL2 and CCL7 expression was observed by inhibition of NF- κ B (43, 44).

These results thus suggest that direct stimulation of CTGF and chemokine expression by the B1R could be involved in the proinflammatory and profibrotic actions of the B1R, although the identity of the cell type involved in this effect remains to be determined. Almost any renal cell type can express functional chemokines *in vivo* (30), and the B1R is potentially expressed on infiltrating macrophages and on resident renal cells in the inflamed kidney. We were not able to perform colocalization experiments, as antibodies against the mouse B1R are not commercially available. Therefore, we carried out bone marrow transplantation experiments to clarify whether decreased expression of CTGF and chemokines induced by B1Ra treatment could be mediated by infiltrating inflammatory or resident renal cells, or both. We performed UUO in wild-type mice reconstituted with either B1^{+/+} bone marrow or bone marrow lacking the B1R gene (B1^{-/-}). Eight days after UUO, there was no difference between mice with B1^{+/+} or B1^{-/-} bone marrow, showing that the absence of the B1R on monocytes/macrophages was without effect on inflammatory cell infiltration, chemokine expression, and interstitial fibrosis. Thus, although the B1R is also expressed on monocytes/macrophages (11), these apparently did not participate in the anti-inflammatory and antifibrotic effects of B1R antagonism. These data strongly suggested that the beneficial effect of the B1R blockade was mainly mediated by resident renal cells.

As recently reviewed, a number of experimental data showed that the progression of renal fibrosis is a reversible process (45). Our data showed that, in UUO-induced fibrosis, delayed B1Ra administration leads to reversion of fibrosis. However, we must remain cautious in our interpretation, because the UUO model is an accelerated model of interstitial fibrosis. We are currently validating these data on chronic kidney disease models where interstitial fibrosis appears more progressively.

Because of its inducible character, mainly localized at the site of inflammation, it has been suggested that blocking the B1R will be potentially without significant side effects. This has drawn attention to the B1R as a

new therapeutic target for the treatment of pathologies related to chronic inflammation, such as airway inflammation, diabetic neuropathy, arthritis, and chronic and neuropathic pain (46). An additional advantage over other potential antifibrotic agents is that the B1R antagonist is already orally available (24).

Because failure of many organs [lung (47), liver (48), and heart (49)] is often associated with the development of fibrosis, our study should be considered as a "proof of concept" of the therapeutic potential associated with B1R blockade. 

This study was mainly funded by INSERM and the Université Toulouse III Paul Sabatier and by grants from Sanofi-Aventis. J.D. is supported by a Basic Science Fellowship of the Barts and the London Charity. P.C. is an employee of Sanofi-Aventis. We thank S. Schaak for technical advice and help.

REFERENCES

- Meguid El Nahas, A., and Bello, A. K. (2005) Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* **365**, 331–340.
- Klahr, S., Schreiner, G., and Ichikawa, I. (1988) The progression of renal disease. *N. Engl. J. Med.* **318**, 1657–1666.
- Nath, K. A. (1992) Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* **20**, 1–17.
- Iwano, M., and Neilson, E. G. (2004) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13**, 279–284.
- Boor, P., Sebekova, K., Ostendorf, T., and Floege, J. (2007) Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, 3391–3407.
- Nguyen, T. Q., and Goldschmeding, R. (2008) Bone morphogenetic protein-7 and connective tissue growth factor: novel targets for treatment of renal fibrosis? *Pharm. Res.* **10**, 2416–2426.
- Strutz, F. (2001) Potential methods to prevent interstitial fibrosis in renal disease. *Expert Opin. Invest. Drugs* **10**, 1989–2001.
- Nathan, C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852.
- Kluth, D. C., Erwig, L. P., and Rees, A. J. (2004) Multiple facets of macrophages in renal injury. *Kidney Int.* **66**, 542–557.
- Eddy, A. A. (2005) Progression in chronic kidney disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **12**, 353–365.
- Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J., and Zuraw, B. L. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.* **57**, 27–77.
- Schanstra, J. P., Neau, E., Drogoz, P., Arevalo Gomez, M. A., Lopez Novoa, J. M., Calise, D., Pecher, C., Bader, M., Girolami, J. P., and Bascands, J. L. (2002) In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110**, 371–379.
- Padluczyk, I. Z., Patel, S. R., and Harris, K. P. (2004) The role of bradykinin in the antifibrotic actions of perindoprilatol on human mesangial cells. *Kidney Int.* **65**, 1240–1251.
- Okada, H., Watanabe, Y., Kikuta, T., Kobayashi, T., Kanno, Y., Sugaya, T., and Suzuki, H. (2004) Bradykinin decreases plasminogen activator inhibitor-1 expression and facilitates matrix degradation in the renal tubulointerstitium under angiotensin-converting enzyme blockade. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2404–2413.
- Seccia, T. M., Belloni, A. S., Guidolin, D., Sticchi, D., Nussdorfer, G. G., Pessina, A. C., and Rossi, G. P. (2006) The renal antifibrotic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition involve bradykinin B2 receptor activation in angiotensin II-dependent hypertension. *J. Hypertens.* **24**, 1419–1427.
- Marin-Castano, M. E., Schanstra, J. P., Pradde, F., Pesquero, J. B., Ader, J. L., Girolami, J. P., and Bascands, J. L. (1998) Differential induction of functional B1-bradykinin receptors along the rat nephron in endotoxin induced inflammation. *Kidney Int.* **54**, 1888–1898.

17. Tiffany, C. W., and Burch, R. M. (1989) Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* **247**, 189–192.
18. Ahluwalia, A., and Perreault, M. (1996) Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J. Immunol.* **156**, 269–274.
19. Bockmann, S., and Paegelow, I. (2000) Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 587–592.
20. Ricupero, D. A., Romero, J. R., Rishikof, D. C., and Goldstein, R. H. (2000) Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 12475–12480.
21. Schanstra, J. P., Marin-Castano, M. E., Pradaude, F., Tack, I., Ader, J. L., Girolami, J. P., Bascands, J. L., and Jeunier, B. (2000) Bradykinin B(1) receptor-mediated changes in renal hemodynamics during endotoxin-induced inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1208–1215.
22. Kakoki, M., McGarrah, R. W., Kim, H. S., and Smithies, O. (2007) Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7576–7581.
23. Wang, P. H., Cenedeze, M. A., Pesquero, J. B., Pacheco-Silva, A., and Camara, N. O. (2006) Influence of bradykinin B1 and B2 receptors in the immune response triggered by renal ischemia-reperfusion injury. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 1960–1965.
24. Gougat, J., Ferrari, B., Sarran, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Maruani, J., Alonso, R., Cudennec, A., Croci, T., Guagnini, F., Urban-Szabo, K., Martinolle, J. P., Soubrie, P., Finance, O., and Le Fur, G. (2004) SSR240612 [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[(2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl)phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**, 661–669.
25. Pesquero, J. B., Araujo, R. C., Heppenstall, P. A., Stucky, C. L., Silva, J. A., Jr., Walther, T., Oliveira, S. M., Pesquero, J. L., Paiva, A. C., Calixto, J. B., Lewin, G. R., and Bader, M. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8140–8145.
26. Mori, M. A., Araujo, R. C., Reis, F. C., Sgzi, D. G., Fonseca, R. G., Barros, C. C., Merino, V. F., Passadore, M., Barbosa, A. M., Ferrari, B., Carayon, P., Castro, C. H., Shimuta, S. L., Luz, J., Bascands, J. L., Schanstra, J. P., Even, P. C., Oliveira, S. M., Bader, M., and Pesquero, J. B. (2008) Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes* **57**, 1491–1500.
27. De Winther, M. P., and Heeringa, P. (2003) Bone marrow transplantations to study gene function in hematopoietic cells. *Methods Mol. Biol.* **209**, 281–292.
28. Bascands, J. L., and Schanstra, J. P. (2005) Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* **68**, 925–937.
29. Tsou, C. L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P., Mack, M., and Charo, I. F. (2007) Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **117**, 902–909.
30. Segerer, S., Nelson, P. J., and Schlondorff, D. (2000) Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 152–176.
31. Ni, A., Yin, H., Agata, J., Yang, Z., Chao, L., and Chao, J. (2003) Overexpression of kinin B1 receptors induces hypertensive response to des-Arg9-bradykinin and susceptibility to inflammation. *J. Biol. Chem.* **278**, 219–225.
32. Becker, G. J., and Hewitson, T. D. (2000) The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **9**, 133–138.
33. Kovesdy, C. P., and Kalantar-Zadeh, K. (2008) Novel targets and new potential: developments in the treatment of inflammation in chronic kidney disease. *Expert Opin. Invest. Drugs* **17**, 451–467.
34. Khwaja, A., El Kossi, M., Floege, J., and El Nahas, M. (2007) The management of CKD: a look into the future. *Kidney Int.* **72**, 1316–1323.
35. Souza, D. G., Lomez, E. S., Pinho, V., Pesquero, J. B., Bader, M., Pesquero, J. L., and Teixeira, M. M. (2004) Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J. Immunol.* **172**, 2542–2548.
36. Marin-Castano, M. E., Schanstra, J. P., Neau, E., Pradaude, F., Pecher, C., Ader, J. L., Girolami, J. P., and Bascands, J. L. (2002) Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* **105**, 627–632.
37. Seguin, T., Buleon, M., Destrupe, M., Ranera, M. T., Couture, R., Girolami, J. P., and Tack, I. (2008) Hemodynamic and renal involvement of B1 and B2 kinin receptors during the acute phase of endotoxin shock in mice. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 217–221.
38. Chevalier, R. L. (2006) Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **2**, 157–168.
39. Sung, S. A., Jo, S. K., Cho, W. Y., Won, N. H., and Kim, H. K. (2007) Reduction of renal fibrosis as a result of liposome encapsulated clodronate induced macrophage depletion after unilateral ureteral obstruction in rats. *Nephron. Exp. Nephrol.* **105**, e1–e9.
40. Border, W. A., and Noble, N. A. (1997) TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int.* **51**, 1388–1396.
41. Okada, H., Kikuta, T., Kobayashi, T., Inoue, T., Kanno, Y., Takigawa, M., Sugaya, T., Kopp, J. B., and Suzuki, H. (2005) Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 133–143.
42. Schanstra, J. P., Bataille, E., Marin Castano, M. E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J. B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J. P., and Bascands, J. L. (1998) The B1-agonist [des-Arg(10)-kallidin] activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **101**, 2080–2091.
43. Cuaz-Pereira, C., Billiet, L., Bauge, E., Copin, C., Scott-Algara, D., Genze, F., Buchele, B., Syrovets, T., Simmet, T., and Rouis, M. (2008) Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE-/- mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 272–277.
44. Wuyts, W. A., Vanaudenaerde, B. M., Dupont, L. J., Demedts, M. G., and Verleden, G. M. (2003) Involvement of p38 MAPK, JNK, p42/p44 ERK and NF-kappaB in IL-1beta-induced chemokine release in human airway smooth muscle cells. *Respir. Med.* **97**, 811–817.
45. Chatziantoniou, C., and Dussaule, J. C. (2008) Is kidney injury a reversible process? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 76–81.
46. Campos, M. M., Leal, P. C., Yunes, R. A., and Calixto, J. B. (2006) Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 646–651.
47. Meltzer, E. B., and Noble, P. W. (2008) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet. J. Rare Dis.* **3**, 1–15.
48. Wallace, K., Burt, A. D., and Wright, M. C. (2008) Liver fibrosis. *Biochem. J.* **411**, 1–18.
49. Diez, J., Gonzalez, A., Lopez, B., and Querejeta, R. (2005) Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2**, 209–216.

Received for publication July 21, 2008.
Accepted for publication August 21, 2008.

Blockade of the Kinin B1 Receptor Ameliorates Glomerulonephritis

Julie Klein,^{*†} Julien Gonzalez,^{*†} Stéphane Decramer,^{*‡} Flavio Bandin,^{*‡} Eric Neau,^{*†} David J. Salant,[§] Peter Heeringa,^{||} Joao-Bosco Pesquero,^{||} Joost-Peter Schanstra,^{*†} and Jean-Loup Bascands^{*†}

^{*}INSERM, U858/12MR, Department of Renal and Cardiac Remodeling, Team 5, Toulouse, France; [†]Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; [‡]Department of Pediatric Nephrology, Centre de Référence du Sud Ouest des Maladies Rénales Rares, Hôpital Purpan, Toulouse, France; [§]Department of Medicine, Evans Biomedical Research Center, Boston University Medical Center, Boston, Massachusetts; ^{||}Department of Pathology and Medical Biology University Medical Center Groningen, Hanzeplein 1, Groningen, Netherlands; and [¶]Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Severe inflammation characterizes rapidly progressive glomerulonephritides, and expression of the kinin B1 receptor (B1R) associates with inflammation. Delayed B1R blockade reduces renal inflammation in a model of unilateral ureteral obstruction, but whether B1R modulates the pathophysiology of glomerulonephritides is unknown. Here, we observed an association of B1R protein expression and inflammation, in both glomeruli and the renal interstitium, in biopsies of patients with glomerulonephritides, Henoch-Schönlein purpura nephropathy, and ANCA-associated vasculitis. In the nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis model, we observed upregulation of the B1R receptor; treatment with a B1R antagonist beginning 2 weeks after the onset of disease reduced both glomerular and tubular lesions and improved renal function. B1R blockade reduced renal chemokine expression and macrophage accumulation. Collectively, our data demonstrate that blockade of the kinin B1R has significant potential for the treatment of glomerulonephritis.

J Am Soc Nephrol 21: ●●●-●●●, 2010. doi: 10.1681/ASN.2009090887

Rapidly progressive glomerulonephritides constitute a group of kidney diseases sharing common pathologic features. These nephropathies are characterized by severe glomerular inflammation, mainly composed of infiltrating macrophages and T cells. This leads to the formation of glomerular crescents composed of immune and proliferating epithelial cells from the Bowman's capsule. After the primary glomerular insult, inflammation and lesions extend to the tubulointerstitial compartment and induce tubular damage and progressive interstitial fibrosis, leading to the loss of renal function; therefore, renal inflammation is a key player in the initiation and the progression of these pathologies. It has been suggested that any strategy or agent able to limit or attenuate renal inflammation should significantly slow the progression of glomerulonephritides to ESRD.¹

Endogenous kinins (bradykinin-related peptides)

are produced through cleavage of kininogens by kallikreins. These peptides mediate their biologic effects by activation of two G protein-coupled receptors: a constitutively expressed B2 receptor (B2R) and an inducible B1 receptor (B1R).² Bradykinin and kallidin are the natural agonists of the B2R, whereas their metabolites, generated by the enzyme kininase I, des-Arg9-BK and Lys-des-Arg9-BK, respectively, are spe-

Received September 1, 2009. Accepted March 11, 2010.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Joost-Peter Schanstra or Dr. Jean-Loup Bascands, INSERM, U858/12MR, Department of Renal and Cardiac Remodeling, Team 5, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Phone: +33561323749; Fax: +33562172554; E-mail: joost-peter.schanstra@inserm.fr or jean-loup.bascands@inserm.fr

Copyright © 2010 by the American Society of Nephrology

cific for the B1R. The B1R is poorly expressed under physiologic conditions and induced, mainly under inflammatory conditions, in a variety of tissues.³ In addition, a number of studies support the *in vivo* generation of B1 agonist under pathologic conditions.^{3,4} Under experimental renal inflammation, a marked up-regulation of the B1R expression along the rat nephron has been reported.^{5,6} In this inflammatory context, it has been shown that the B1R agonist is able to upregulate the expression of its own receptor via the activation of transcription factor NF- κ B.^{7,8}

The activated B1R stimulates the release of proinflammatory cytokines including TNF- α and IL-1 β and is also involved in leukocyte accumulation and activation.^{10,11} Little is known about the role of the B1R in human (patho)physiology, but in animal models, an attenuated inflammatory response has been observed in B1R knockout mice in pleurisy and paw edema¹² as well as in a model of intestinal ischemia and reperfusion injury.¹³ Specific inflamed organ-induced B1R expression and the availability of an orally active B1R antagonist (B1Ra) has made the B1R a potential therapeutic target for the treatment of pathologies related to chronic inflammation, such as atherosclerosis, airway inflammation, diabetic neuropathy, arthritis, and neuropathic pain.^{14,15} Indeed, since the work of Gougat *et al.*¹⁶ describing the selectivity of this orally active B1Ra, a number of original *in vivo* studies have reported its therapeutic potential in inflammatory bowel disease,¹⁷ skin inflammatory diseases,¹⁸ sensory polyneuropathy,¹⁹ and neuropathic pain.²⁰

The role of the B1R in renal inflammation has been poorly investigated. We recently reported in the unilateral ureteral obstruction (UUO) model that preventive and, much more interesting, delayed treatment with an orally active nonpeptide B1Ra blocked monocyte/macrophage infiltration involving a direct inhibition of chemokine expression by resident renal cells. This was associated with reduced tubulointerstitial fibrosis.²¹ The promising results obtained using the UUO model led us to study the role and the therapeutic potential of the B1R in glomerulonephritides.

We show here for the first time induction of the B1R associated with overt inflammation in two of the most common forms of human glomerulonephritides (pediatric and adult): Henoch-Schönlein purpura nephropathy (HSPN) and ANCA-associated crescentic glomerulonephritis. We then investigated whether, after establishment of inflammation, delayed blockade of the B1R inhibited the progression of nephrotoxic serum (NTS)-induced glomerulonephritis, the mouse immune model of progressive glomerulonephritis.

RESULTS

B1R mRNA Is Expressed in Human Renal Biopsies of Henoch-Schönlein Purpura

To investigate whether the B1R was induced in patients with rapidly progressive glomerulonephritis, we analyzed B1R mRNA expression in biopsies from pediatric patients with HSPN ($n = 5$) compared with patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS; $n = 3$). MCNS is different from glomerulonephritis because it is a syndrome characterized by discrete lesions of

glomerular epithelial cells but without signs of inflammation and crescent formation. A significant induction of B1R-mRNA was found in renal biopsies of HSPN compared with MCNS (Figure 1).

B1R Is Induced in Human Renal Biopsies of Henoch-Schönlein Purpura and ANCA-Associated Vasculitis

To support these results on the level of mRNA expression, we retrospectively analyzed biopsies from pediatric patients with HSPN ($n = 20$), from adult patients with ANCA-associated vasculitis (AAV; $n = 13$), and from patients with MCNS ($n = 9$; Figure 2A). As control kidney tissue, we used the nonpathologic regions of kidneys from patients who underwent kidney tumorectomy ($n = 10$). All of the biopsies were scored for inflammation, and B1R-positive cells were identified by immunohistochemical staining with the specific, in-house-developed human B1R antibody K21N.⁷ The B1R localization in these different nephropathies can be found together with clinical data and anatomopathologic scores in Figure 2A.

B1R staining was absent in nonpathologic regions of kidney sections of renal tumors (Figure 2B, Control) and in biopsies obtained from patients with MCNS (Figure 2B, MCNS). All MCNS biopsies scored negative for inflammation (Figure 2A). Very interestingly, in HSPN biopsies, we observed epithelial and interstitial B1R staining associated with clear inflammation (score 2+; Figure 2, HSPN $\times 200$ and enlargement). In addition, in biopsies of AAV, with severe glomerular and interstitial inflammation (score 3+; Figure 2A), we observed B1R staining in the tubulointerstitial cellular compartment together with B1R expression in crescentic glomeruli (Figure 2B, AAV $\times 200$ and enlargement).

Renal B1R Expression Is Induced in the Mouse Model of NTS-Induced Glomerulonephritis

The studies on human biopsies suggested specific association of B1R expression with glomerular and interstitial in-

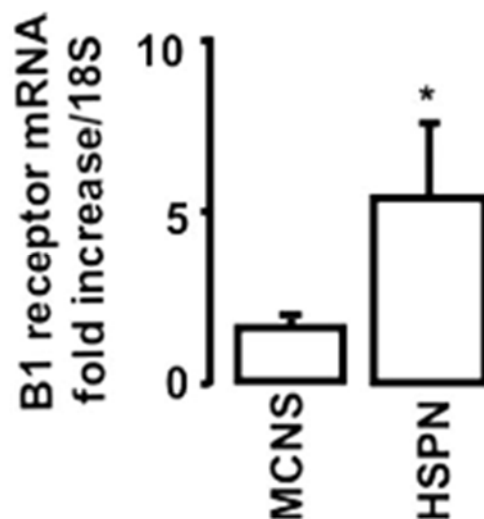


Figure 1. B1R mRNA is upregulated in HSPN. B1 mRNA expression levels in renal biopsies was quantified by real-time PCR. * $P < 0.05$ versus MCNS.

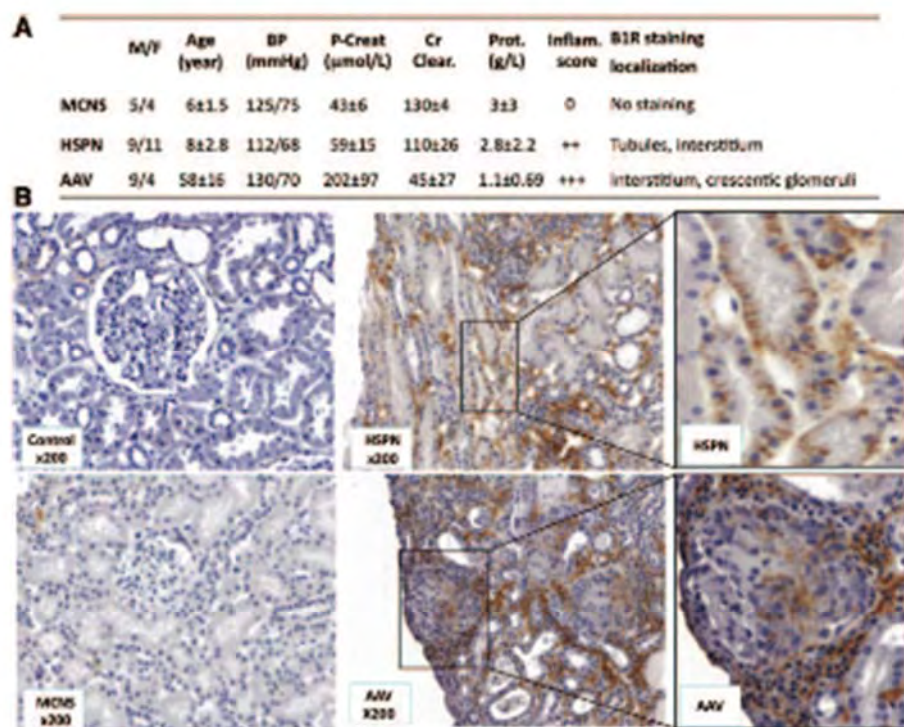


Figure 2. Representative human B1R expression in normal and pathologic human kidney biopsies. (A) Clinical data, anatomopathologic scores, and B1R localization from patients selected for immunohistochemical analysis of human renal biopsies are summarized. Data are means \pm SEM. M/F, male/female; P-creat, plasma creatinine; Cr Clear., creatinine clearance; Prot., proteinuria; Inflam., inflammation. (B) Immunohistochemical staining of B1R in renal biopsies. Control, nonpathologic regions of renal tumors. Magnification, $\times 200$.

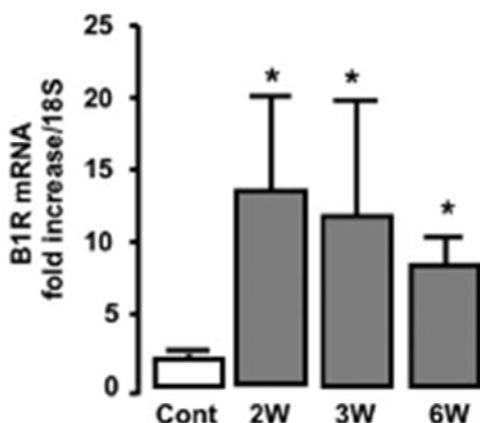


Figure 3. B1R mRNA expression is induced during NTS-induced nephritis. The B1R mRNA expression is assessed by B1R mRNA quantification using real-time PCR ($n = 6$ mice per group). Cont, control mice; W, week. * $P < 0.05$ versus control.

inflammation in human glomerulonephritis. To study the role of B1R induction in rapidly progressive glomerulonephritis, we used the murine model of NTS-induced glomerulonephritis.²² Consistent with what we observed in human biopsies, renal B1R mRNA was induced in this model 2

weeks after NTS administration and persisted until at least week 6, the latest time point in our study (Figure 3). Because our K21N antibody against B1R was raised against the last 21 amino acids of the carboxy-terminal domain of the human B1R, which is absent in the rodent B1R, and because no commercially available antibody works in our hands, we have been unsuccessful in detecting B1R protein in the mouse kidney sections.

Delayed B1Ra Treatment Improves Glomerular and Tubular Lesions and Blood Creatinine in NTS-Induced Glomerulonephritis

We next investigated whether delayed oral B1Ra treatment was effective in protecting the development of lesions during established immune glomerulonephritis. Vehicle-treated mice developed progressive renal injury from week 2 to week 6 as shown by increased crescent formation, cast deposits, and tubular atrophy. In contrast, delayed treatment with a B1Ra (SSR240612, 10 mg/kg every other day), initiated 2 weeks after NTS injection and continued until week 6, showed substantial improvement of the glomerulonephritis-induced lesions (Figure 4, A through E).

This model of glomerulonephritis induces progressive decline of renal function. We measured plasma creatinine in control mice and NTS vehicle- or B1Ra-treated mice at week 6. Compared with control mice, NTS mice exhibited increased plasma creatinine levels. Very interestingly, we observed that reduction of renal lesions by delayed B1Ra treatment was associated with significant improvement of renal function (Figure 4F).

B1R Blockade Reduces Fibrosis during NTS-Induced Glomerulonephritis

We next evaluated the therapeutic effect of delayed B1R blockade on the progression of renal fibrosis. We immunostained sections for the extracellular matrix protein collagen III followed by histomorphometric analysis of the cortical collagen content. As shown in Figure 5, NTS administration significantly induced interstitial and glomerular fibrosis in vehicle-treated mice (Figure 5, B, E, and G) compared with control mice (Figure 5, A, D, and G). This effect was significantly inhibited by delayed B1Ra treatment (Figure 5, C, F, and G).

Delayed B1R Blockade Reduces NTS-Induced Chemokine Expression and Renal Inflammation

We previously demonstrated that the B1R can modulate chemokine expression and inflammatory cell recruitment.²¹ We

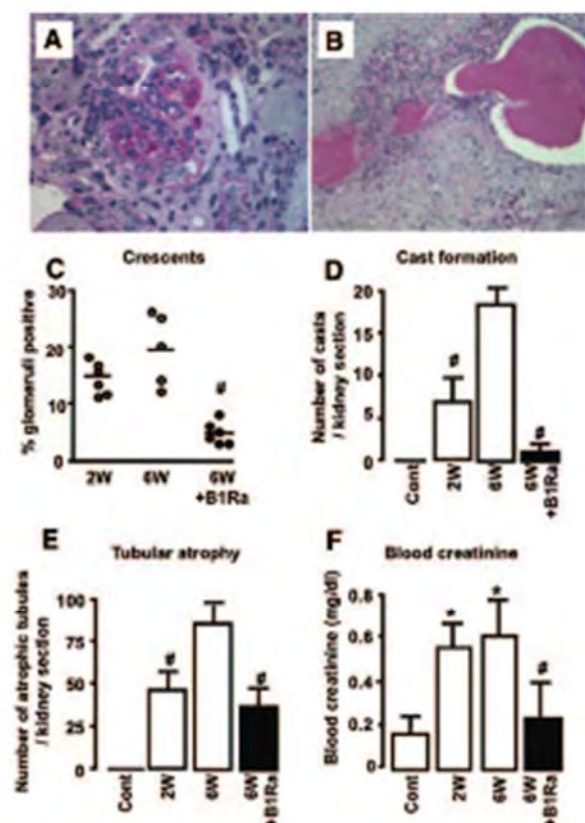


Figure 4. Delayed B1Ra treatment reduces renal lesions and improves renal function. (A and B) Representative photographs of crescent and cast formation $\times 400$. (A through E) Crescent (A and C) and cast formation (B and D), as well as tubular atrophy (E), were assessed by periodic acid-Schiff staining after 2 and 6 weeks of NTS in vehicle-treated (\square or \square) or B1Ra-treated (\bullet or \blacksquare) mice. (F) Renal function is evaluated by measuring blood creatinine ($n = 6$ mice per group). Cont, control mice; W, week. * $P < 0.05$ versus control; # $P < 0.05$ versus 6 weeks.

analyzed the effect of delayed B1R blockade in the glomerulonephritis model on CCL2 (Figure 6A), CCL7 (Figure 6B), and CCL5 (Figure 6C) mRNA expression, three chemokines known to be involved in the inflammatory process.^{22–24} We observed that delayed B1Ra treatment blunted NTS-induced chemokine upregulation (Figure 6).

We next assessed the effect of B1R blockade on inflammatory cell recruitment. Because macrophages have been shown to be crucial for the progression of glomerulonephritis, we quantified macrophage accumulation by immunohistologic staining for F4/80. We observed that NTS administration induced a strong macrophage infiltrate in the interstitial space and in crescentic glomeruli (Figure 7, B and E) compared with control mice (Figure 7, A and D). The inhibitory effect of B1R blockade on renal chemokine expression was associated with a reduced macrophage infiltrate after 6 weeks of glomerulonephritis (Figure 7, C, F, and G). We also studied the effect of the treatment on the renal expression of CD4 (Figure 8A), CD8 (Figure 8B), and Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion mole-

cule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) (Figure 8C), three markers for CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and dendritic cells (DCs), respectively. We found that B1Ra treatment significantly inhibited the expression of these markers during NTS-glomerulonephritis (Figure 8).

DISCUSSION

Collectively, our results show that the renal B1R is induced in human rapidly progressive glomerulonephritis and that delayed administration of a B1Ra can reduce the development of renal inflammation and lesions and improve renal function in the murine experimental model of NTS-induced glomerulonephritis. Glomerulonephritides constitute a group of diseases characterized by strong inflammation leading to crescent formation, tubular atrophy, fibrosis, and progressive renal failure. As recently reviewed, future therapy for these nephropathies should ideally target the renal inflammatory response¹; however, nontoxic immunomodulatory molecules are still lacking.¹ Because of its inducible character at the site of inflammation in different tissues, it has been suggested that blocking the proinflammatory B1R will be potentially without significant adverse effects. This has drawn attention to the B1R as a new therapeutic target for the treatment of pathologies related to chronic inflammation, such as airway inflammation, diabetic neuropathy, arthritis, and chronic and neuropathic pain.¹⁵ We and others previously described that B1R blockade can reduce the development of inflammation and subsequent fibrosis in the UUO model^{21,25}; however, it remained unknown whether blockade of the B1R can inhibit immune nephropathies.

The association between B1R expression and inflammation is well described both *in vitro* and *in vivo* in animals; however, little is known about the expression of the B1R in humans. We investigated whether the B1R was expressed in human renal biopsies obtained from patients with rapidly progressive glomerulonephritis, AAV and Henoch-Schönlein purpura. Although undetectable in biopsies from control subjects and patients with MCNS, the human B1R is clearly induced in these nephropathies, as evidenced by the localization on tubular epithelial cells of diagnostic biopsies from patients with HSPN as well as in crescentic glomeruli from patients with vasculitis. The latter is consistent with a previous study showing the presence of the B1R agonist by using specific anti-peptide antibodies, mainly in glomeruli but also in proximal and distal tubuli from patients with vasculitis.²⁶ B1R staining in the interstitial inflammatory and fibrotic space is consistent with previous reports describing B1R expression in macrophages and fibroblasts *in vitro*.^{3,9,27} Although additional experiments are needed to define better the interstitial cells that express the B1R, the most important conclusion to be drawn from our data is that the B1R is not detectable in control kidney biopsies but

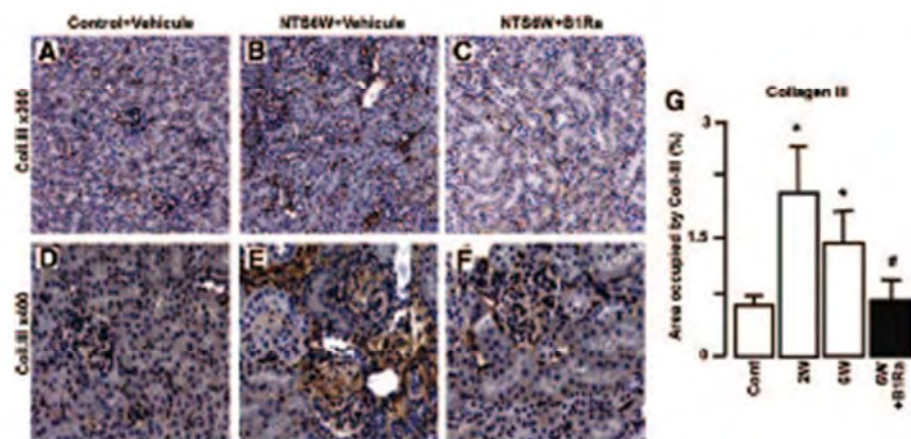


Figure 5. B1R blockade inhibits the development of renal fibrosis. (A through F) The development of renal fibrosis is quantified by immunohistologic staining for collagen III in control mice (A and D) and vehicle-treated (B and E) or B1Ra-treated (C and F) mice 6 weeks after NTS administration. Representative pictures are shown. (G) Quantitative analysis of collagen III immunostaining ($n = 6$ mice per group). Cont, control mice; W, week. * $P < 0.05$ versus control; # $P < 0.05$ versus 6 weeks. Magnifications: $\times 200$ in A through C; $\times 400$ in D through F.

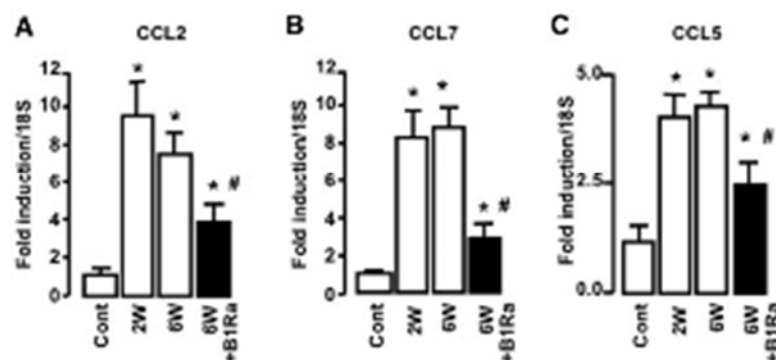


Figure 6. Delayed B1Ra treatment inhibits chemokine expression during NTS-glomerulonephritis. (A through C) CCL2 (A), CCL7 (B), and CCL5 (C) expression is quantified using real-time PCR 2 and 6 weeks after NTS injection in vehicle-treated (□) or B1Ra-treated (■) mice ($n = 6$ mice per group). Cont, control mice; W, week. * $P < 0.05$ versus control; # $P < 0.05$ versus 6 weeks.

clearly is expressed in pathologic biopsies from patients with glomerulonephritis.

We next evaluated the therapeutic potential of B1R delayed blockade in the murine model of accelerated NTS-glomerulonephritis. To mimic the human pathologic situation, whereby patients are treated in the presence of overt pathology, we chose to administer the B1Ra 2 weeks after the onset of the pathology. We observed reduction of renal lesions including crescent formation, cast deposits, tubular atrophy, and interstitial fibrosis. Moreover, after 4 weeks of treatment, we showed a significant improvement of renal function. As evidenced by a number of studies, interstitial inflammation constitutes an early and major event in response to NTS.^{22,28,29} We showed here that delayed B1Ra treatment reduced significantly macrophage recruitment and diminished the mRNA expression of markers for CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, three

populations of immune cells involved in the inflammatory response in the NTS model.^{22,28,29} The role of the B1R on T lymphocyte recruitment has been poorly investigated, leading to controversial results. A recent study demonstrated that B1R knockout mice showed more severe disease in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis and this was associated with enhanced Th17 cell infiltration.³⁰ In contrast, in a model of murine lung inflammation, B1R blockade showed no effect on T lymphocyte number.³¹ Independent of these controversial results on the B1R, our results are in agreement with a study that conditional ablation of macrophages 2 weeks after the induction of NTS-glomerulonephritis improved renal lesions and interstitial fibrosis and that this effect was associated with a reduction of CD4⁺ cells.²⁹

DCs are known to be present in the healthy tubulointerstitium, where they perform sentinel functions. During acute renal injury, DCs alert the immune system and regulate T cell activation. The role of these cells in experimental glomerulonephritis has been debated recently. Depletion of DCs has been shown to be deleterious in the acute phase of NTS-glomerulonephritis (i.e., 2 weeks after NTS).³² Indeed, the authors showed that these cells induce IL-10 producing CD4⁺ cell infiltration with anti-inflammatory effects³²; however, using the NOH model, in which transgenic mice express the model antigens ovalbumin and hen egg lysozyme in glomerular podocytes, it was observed

that during chronic crescentic glomerulonephritis, renal DCs are a link between the glomerular injury and the progression of kidney disease toward the tubulointerstitial compartment.³³ This suggests that targeting DCs could improve chronic kidney disease progression. Our data support this hypothesis by showing that the protective effect of delayed B1R blockade is associated with a reduction of DC-SIGN mRNA in our progressive model of NTS-glomerulonephritis.

A number of chemokines are involved in renal inflammatory cell infiltration.³⁴ The role of CCL2/MCP1,^{22,23} CCL5/RANTES,²² and CCL7/MCP3³⁴ is clearly established in this process. Our data show reduced renal expression of these three chemokines in response to B1Ra treatment in the NTS model. This is consistent with previous reports showing that in the NTS model, CCL2/MCP1 knockout mice or mice treated with an anti-CCL2-neutralizing antibody present less inflammation, fewer renal lesions,

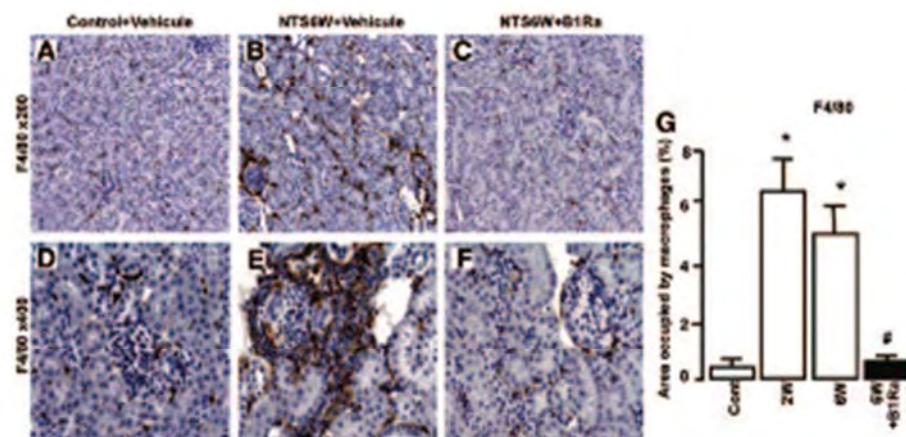


Figure 7. B1R blockade inhibits macrophage infiltration. (A through F) Macrophage number is quantified by immunohistologic staining for F4/80 in control mice (A and D) and vehicle-treated (B and E) or B1Ra-treated (C and F) mice 6 weeks after NTS administration. Representative pictures are shown. (G) Quantitative analysis of F4/80 immunostaining (n = 6 mice per group). Cont, control mice; W, week. *P < 0.05 versus control; #P < 0.05 versus 6 weeks. Magnifications: $\times 200$ in A through C; $\times 400$ in D through F.

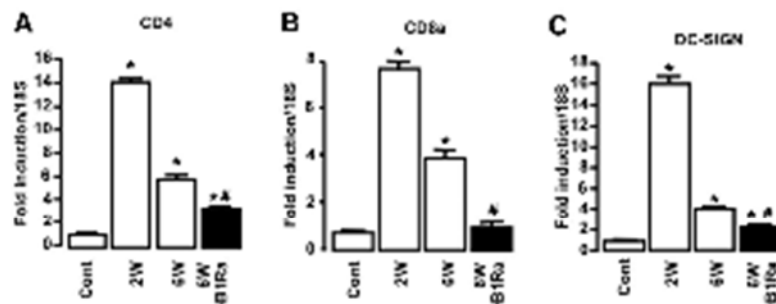


Figure 8. Delayed B1R blockade blunts NTS-induced upregulation of mRNA markers of T lymphocytes and DCs. (A through C) Expression of CD4 (A), CD8 (B), and DC-SIGN (C) mRNA was quantified using real-time PCR 2 and 6 weeks after NTS injection in vehicle-treated (□) or B1Ra-treated (■) mice (n = 6 mice per group). Cont, control mice; W, week. *P < 0.05 versus control; #P < 0.05 versus 6 weeks.

and less renal fibrosis compared with control mice.^{22,24} Moreover, mice treated with a CCL5 antagonist showed reduced inflammation and improved renal function, without significant modification of renal lesions.²²

Although we are aware that human chronic kidney disease is much more complex than in experimental models and that clinical trials for such disease need studies of long duration, we propose that B1R blockade with an orally active B1Ra might be an efficient strategy to prevent or significantly slow the progression of inflammatory kidney diseases in humans and should be evaluated against and in combination with established therapies.

CONCISE METHODS

Drug

B1Ra SSR240612 was a gift of Sanofi-Aventis R&D Montpellier-France (P. Carayon¹⁴). For *in vivo* experiments, this compound was dissolved in water containing 2% DMSO to obtain a 1-g/L solution.

The SSR240612 solution was diluted with distilled water and administered by gavage. Final DMSO concentration was 0.01%.

Human Kidney Specimens

We retrospectively analyzed paraffin sections of renal biopsies from patients (pediatric and adults) who underwent diagnostic evaluation from 2001 through 2005. A recent approved pediatric clinical project (PHRC-AOL 0507302-2006) allowed us to obtain mRNA from biopsies stored in a commercially available RNase inhibitor solution (RNAlater; Ambion). Informed consent was given by the patients or their parents for use of part of the biopsy for scientific purpose. All procedures and use of tissue were performed according to national ethical guidelines and were in accordance with the Declaration of Helsinki.

Animals

The mice were housed in a pathogen-free environment. All experiments reported were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by a local animal care and use committee.

Glomerulonephritis

The protocol and the preparation of the NTS used have been previously described.²² Briefly CD-1 male mice of 6 weeks of age were preimmunized by subcutaneous injection of 200 μ g of normal sheep IgG (Sigma) in Freund's complete adjuvant (Sigma). Five days later, immunization was performed by intravenous injection of 50 μ L of NTS into the tail vein for 3 consecutive days.²² Mice were maintained on a standard mouse chow and tap water. Treatment with the B1Ra at 10 mg/kg (dosage selected on the basis of literature data)^{16,19–21} was initiated 2 weeks after nephritis induction and continued throughout the time of nephritis. The dosage of the B1Ra was given orally every other day. Control group received by oral route the 0.01% DMSO solution, which had no significant effect on body weight (animals receiving the B1Ra, body weight at 6 weeks 39.08 ± 4.80 g versus control animals receiving only the 0.01% DMSO solution 38.08 ± 1.40 g). Mice were killed at various time points, and the kidneys were removed and divided into different parts according to the different protocols used. Plasma was collected to measure blood creatinine (Creatinine CP; HORIBA-ABX) with the COBAS Mira Plus device.

Histologic Analysis and Immunohistochemistry

From paraffin-embedded biopsies, we performed routine histology. Four-micrometer sections were cut and used for routine staining (he-

matoxylin-eosin and periodic acid-Schiff staining) and immunohistochemistry. All human biopsies were scored (from 0+ to 3+) by an expert pathologist who was blinded to the clinical data to evaluate the presence of inflammatory infiltrates, glomerulosclerosis, and interstitial fibrosis. For immunohistochemistry, human and mouse renal tissue were first de-waxed in toluene and rehydrated through a series of graded ethanol washes before endogenous peroxidase blockage. Specific primary antibodies were incubated (1 hour at room temperature) on human or mouse sections for the detection of B1R (1:5000),⁷ collagen type III (1:500; Interchim), and anti-mouse F4/80 (1:250; RM2900; Caltag laboratories Inc., Burlingame, CA). For visualization, we used the Dako Envision system. Sections were finally counterstained with hematoxylin. Negative controls for the immunohistochemical procedures included substitution of the primary antibody with nonimmune sera.

Histomorphometric analyses were performed as described previously,³⁵ using a commercially available image analysis software that allows rebuilding of a kidney section from adjacent individual captures (Explora Nova Mosaic software, La Rochelle, France). The number of glomerular crescents was determined, by blinded analysis, of at least 100 glomeruli on periodic acid-Schiff-stained kidney sections, and only glomeruli that had two or more layers of cells in Bowman's space were considered crescentic as previously reported.³⁶ Atrophic tubules were identified by their irregular, thickened basement membranes.

Isolation of RNA

Total RNA was isolated from mouse kidney sections or renal biopsies using QIAGEN RNeasy Mini kit, eluted in 20 µl of RNase-free water and treated by DNase (TURBO DNA-free kit; Ambion) according to the manufacturer's protocol. A total of 1.5 µl of this solution was used for quantification by a NanoDrop instrument (ND-1000 spectrophotometer).

cDNA Synthesis

A total of 100 ng of total RNA was used for cDNA synthesis by High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) in a volume of 100 µl following the manufacturer's protocol. We then diluted cDNA by a factor of 1:2.

Quantification of Gene Expression by Real-Time Quantitative PCR

Real-time PCR was performed using the ABI PRISM 7900 HT. PCR amplification was performed in a total volume of 25 µl containing 25 ng of cDNA sample, 300 nM of forward and reverse primer and 12.5 µl of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reaction mixture was preheated at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SD. ANOVA with *post hoc* Tukey α test was performed for comparison between the various groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded in part by the "111 des Arts" project and by the "Egide-Van Gogh" collaborative project. J.K. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale Fellowship Grant. J.L.B. was supported by INSERM and the "Direction Régionale Clinique" (CHU de Toulouse, Toulouse, France) under the Interface program. D.J.S. was supported by research grant DK30932 from the National Institutes of Health. B1Ra SSR240612 was a kind gift of Sanofi-Aventis R&D Montpellier-France (P. Carayon).

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Kitching AR, Holdsworth SR, Hickey MJ: Targeting leukocytes in immune glomerular diseases. *Curr Med Chem* 15: 448–458, 2008
- Regoli D, Barabe J: Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32: 1–46, 1980
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL: International union of pharmacology: XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27–77, 2005
- Marceau F: Kinin B1 receptors: A review. *Immunopharmacology* 30: 1–26, 1995
- Marin-Castano ME, Schanstra JP, Pradde F, Pesquero JB, Ader JL, Girolami JP, Bascands JL: Differential induction of functional B1-bradykinin receptors along the rat nephron in endotoxin induced inflammation. *Kidney Int* 54: 1888–1898, 1998
- Schanstra JP, Marin-Castano ME, Pradde F, Tack I, Ader JL, Girolami JP, Bascands JL: Bradykinin B1 receptor-mediated changes in renal hemodynamics during endotoxin-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol* 11: 1208–1215, 2000
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL: The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 101: 2080–2091, 1998
- Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM: Autoregulation of bradykinin receptors: Agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* 56: 325–333, 1999
- Tiffany CW, Burch RM: Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett* 247: 189–192, 1989
- Ahluwalia A, Perretti M: Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 β in vivo in the mouse. *J Immunol* 156: 269–274, 1996
- Bockmann S, Paegelow I: Kinins and kinin receptors: Importance for the activation of leukocytes. *J Leukoc Biol* 68: 587–592, 2000
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M: Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8140–8145, 2000
- Souza DG, Lomez ES, Pinho V, Pesquero JB, Bader M, Pesquero JL, Teixeira MM: Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local,

- remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 172: 2542–2548, 2004
14. Duchene J, Ahluwalia A: The kinin B(1) receptor and inflammation: New therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 9: 125–131, 2009
 15. Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Calixto JB: Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: New insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27: 646–651, 2006
 16. Gougat J, Ferrari B, Sarrazin L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guegnin F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrie P, Finance O, Le Fur G: SSR240612 [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[(2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: Biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 661–669, 2004
 17. Hara DB, Leite DF, Fernandes ES, Passos GF, Guimaraes AO, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB: The relevance of kinin B1 receptor upregulation in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol* 154: 1276–1286, 2008
 18. Pietrowski EF, Otuki MF, Regoli D, Bader M, Pesquero JB, Cabrini DA, Zampronio AR: The non-peptide kinin receptor antagonists FR 173657 and SSR 240612: Preclinical evidence for the treatment of skin inflammation. *Regul Pept* 152: 67–72, 2009
 19. Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, Couture R: The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 152: 280–287, 2007
 20. Quintao NL, Passos GF, Medeiros R, Paszcuk AF, Motta FL, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB: Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: The relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* 28: 2856–2863, 2008
 21. Klein J, Gonzalez J, Duchene J, Esposito L, Pradere JP, Neau E, Delage C, Calise D, Ahluwalia A, Carayon P, Pesquero JB, Bader M, Schanstra JP, Bascands JL: Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J* 23: 134–142, 2009
 22. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC: RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 185: 1371–1380, 1997
 23. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D: Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11: 152–176, 2000
 24. Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K, Lan HY, Rollins BJ, Kelley VR: Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest* 103: 73–80, 1999
 25. Wang PH, Cenedeze MA, Campanholle G, Malheiros DM, Torres HA, Pesquero JB, Pacheco-Silva A, Camara NO: Deletion of bradykinin B1 receptor reduces renal fibrosis. *Int Immunopharmacol* 9: 653–657, 2009
 26. Kahn R, Herwald H, Muller-Esterl W, Schmitt R, Sjogren AC, Truedsson L, Karpman D: Contact-system activation in children with vasculitis. *Lancet* 360: 535–541, 2002
 27. Ricupero DA, Romero JR, Rishikof DC, Goldstein RH: Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA. *J Biol Chem* 275: 12475–12480, 2000
 28. Cook HT, Singh SJ, Wembridge DE, Smith J, Tam FW, Pusey CD: Interleukin-4 ameliorates crescentic glomerulonephritis in Wistar Kyoto rats. *Kidney Int* 55: 1319–1326, 1999
 29. Duffield JS, Tipping PG, Kipari T, Caillier JF, Clay S, Lang R, Bonventre JV, Hughes J: Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 167: 1207–1219, 2005
 30. Schulze-Topphoff U, Prat A, Prozorovski T, Siffert V, Paterka M, Herz J, Bendix I, Ifergan I, Schadock I, Mori MA, Van Hoesen J, Schroter F, Smorodchenko A, Han MH, Bader M, Steinman L, Aktas O, Zipp F: Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system. *Nat Med* 15: 788–793, 2009
 31. Gama Landgraf R, Sirois P, Jancar S: Differential modulation of murine lung inflammation by bradykinin B1 and B2 selective receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 460: 75–83, 2003
 32. Scholz J, Lukacs-Komek V, Engel DR, Specht S, Kiss E, Eitner F, Floege J, Groene HJ, Kurts C: Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol* 19: 527–537, 2008
 33. Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Groene HJ, Kurts C: Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest* 119: 1286–1297, 2009
 34. Kluth DC, Erwig LP, Rees AJ: Multiple facets of macrophages in renal injury. *Kidney Int* 66: 542–557, 2004
 35. Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, Pecher C, Bader M, Girolami JP, Bascands JL: In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest* 110: 371–379, 2002
 36. Heeringa P, van Goor H, Itoh-Lindstrom Y, Maeda N, Falk RJ, Assmann KJ, Kallenberg CG, Jennette JC: Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine accelerated anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Pathol* 156: 879–888, 2000

Effet de l'inhibition de PAI-1 sur le développement de la fibrose tubulointerstitielle rénale (174)

Delayed treatment with plasminogen activator inhibitor-1 decoys reduces tubulointerstitial fibrosis.

Le système du plasminogène est composé de protéases s'activant en cascade (figure 13) (200-202). Les activateurs du plasminogène (uPA et tPA) clivent le plasminogène en plasmine et peuvent être inhibés par le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Ensuite, la plasmine est capable de dégrader directement des protéines de la MEC telles que la fibronectine, la laminine ou encore le collagène de type IV ou d'activer par clivage des MMP. Son activation ou le blocage de son inhibition pourraient être une piste de recherche afin de diminuer la FTI.

Cette hypothèse est confortée par le fait que, dans de nombreuses pathologies, le PAI-1 est surexprimé (200-202) et que la FTI induite par OUU est diminuée chez des animaux invalidés pour le PAI-1 (203). Cependant, le blocage génétique du PAI-1 intervient bien avant l'induction de la pathologie alors que la plupart des pathologies rénales ne sont détectées et traitées que tardivement.

Dans cette étude, nous avons proposé de traiter des animaux par des leurres du PAI-1. Le traitement quotidien par injection intraveineuse débute au troisième jour post-OUU sur une fibrose établie et se poursuit jusqu'au sacrifice des animaux au huitième jour. Ces fragments peptidiques se lient sur le site de fixation de l'uPA et du tPA empêchant ainsi la formation du complexe et l'inactivation de la cascade.

L'administration de ces peptides ne modifie pas l'influx de macrophages ou l'apparition des myofibroblastes mais réduit de façon spectaculaire l'accumulation de fibronectine (- 60 %), de collagène de type III (-40 %) et du collagène de type IV (- 75 %). Suite à ces observations, nous nous sommes intéressés à l'activité des différentes enzymes du système du plasminogène. Le PAI-1 a une activité faiblement mais significativement diminuée et en conséquence, l'activité des PAs est augmentée d'environ 30 %. Cependant, l'effet est perdu en aval du système puisque les activités de la plasmine, de MMP2 et de MMP9 ne sont pas modifiées. Les moindres taux de MEC observés ne peuvent donc pas s'expliquer par l'augmentation de leur dégradation par les

MMP. Afin de comprendre ces effets, nous avons regardé la sécrétion de la cytokine antifibrosante, hepatocyte growth factor (HGF). Le traitement par les leurres active la production de cette cytokine.

Dans cette étude, nous avons montré que le blocage de PAI-1 par l'administration de leurres peptidiques réduisait fortement l'accumulation de la FTI induite par OUU. Ces effets sont indépendants des MMP activées par le système du plasminogène et peuvent être dus, tout au moins en partie, à une augmentation de la sécrétion de la cytokine antifibrosante, HGF. Pour la première fois, nous mettons en évidence le potentiel thérapeutique du blocage de PAI-1 par des leurres peptidiques sur une FTI déjà installée.

Delayed Treatment with Plasminogen Activator Inhibitor-1 Decoys Reduces Tubulointerstitial Fibrosis

JULIEN GONZALEZ,^{*,†,1} JULIE KLEIN,^{*,†,1} SHARMILA D. CHAUHAN,^{*,†} ERIC NEAU,^{*,†}
DENIS CALISE,[‡] CAROLINE NEVOIT,[‡] RANA CHAAYA,^{*,†} MATHIEU MIRAVETE,^{*,†}
CHRISTINE DELAGE,^{*,†} JEAN-LOUP BASCANDS,^{*,†} JOOST P. SCHANSTRA,^{*,†}
AND BÉNÉDICTE BUFFIN-MEYER^{*,†,2}

**INSERM, F-31432 Toulouse, France; †Université de Toulouse, UPS, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, F-31432 Toulouse, France; and ‡Laboratory of Microsurgery, F-31432 Toulouse, France*

We examined the capacity of delayed inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) to reduce tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. Small peptides mimicking parts of urokinase (uPA) and tissue plasminogen activator (tPA) and serving as decoy molecules for PAI-1 were administered daily during the late stages (3 to 8 days) of UUO. Treatment with PAI-1 decoys reduced interstitial deposition of fibronectin, collagen III and collagen IV without changes in macrophage and myofibroblast infiltration. Interestingly, while PAI-1 activity was reduced and the combined uPA and tPA activity was increased, the antifibrotic effect was obtained without modification of plasmin activity but with increased of hepatocyte growth factor (HGF) expression. We show for the first time that treatment with small PAI-1 decoy peptides reduces established tubulointerstitial fibrosis. This protective effect probably resulted from increased degradation of the extracellular matrix by an HGF dependent mechanism. *Exp Biol Med* 234:000–000, 2009

Key words: PAI-1 inhibition; plasminogen activator; decoys; HGF; ureteral obstruction; tubulointerstitial fibrosis

J. Gonzalez, J. Klein, R. Chaaya and M. Miravete received a grant from the "Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie." S.D. Chauhan was a recipient of grants from both the "Entente Cordiale" and the "Foundation de la Recherche Médicale."

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed at INSERM, U858-I2MR - Equipe 5, 1 avenue Jean Poulhès, B.P. 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. E-mail: benedict.buffin-meyer@inserm.fr

Received March 12, 2009.
Accepted July 29, 2009.

DOI: 10.3181/0903-RM-105
1535-3702/09/23412-000\$15.00
Copyright © 2009 by the Society for Experimental Biology and Medicine

Introduction

End stage renal disease (ESRD) is preceded, in nearly all cases, by the progressive development of renal fibrosis, corresponding to exaggerated accumulation of extracellular matrix (ECM). Tubulointerstitial fibrosis (TIF), compared to glomerular sclerosis, is strongly correlated with evolution towards ESRD (1). Its development is schematically divided into i) inflammation, macrophage and lymphocyte infiltration and an increase in circulating cytokines and chemokines, inducing ii) a disequilibrium between apoptosis and proliferation of tubular cells as well as fibroblast accumulation, followed by iii) secretion of ECM by activated fibroblasts. This increase in fibrotic tissue causes a steady decline of renal function leading to ESRD (1).

The only drugs routinely used in clinical practice to slow down the progression of chronic kidney diseases are the inhibitors of renin/angiotensin system. In addition, there are a limited number of drugs in early phase clinical trials specifically aiming to reduce renal fibrosis. Among the most promising drugs, Pirfenidone, Pentoxifylline, Ruboxistaurin and Rosiglitazone are able to reduce the production of profibrotic cytokines and chemokines (2–5).

In the search for antifibrotic drugs, plasminogen system has drawn attention. Indeed ECM degradation is thought to be largely dependent on this system primarily via the activation of latent matrix metalloproteinases (MMPs) (6). Plasmin is a serine protease which can directly degrade matrix proteins fibronectin, laminin (7) and type IV collagen (8) and activate MMPs (9). Plasmin is generated from plasminogen by two types of plasminogen activators (PAs), uPA and tPA, and the activity of both PAs is inhibited by PAI-1. Because PAI-1 is upregulated in many renal diseases (6), its inhibition should reactivate ECM degradation and thereby induce reversal of fibrosis.

The tubulointerstitial fibrogenic response to UUO is attenuated in PAI-1-knockout mice (10). However in this

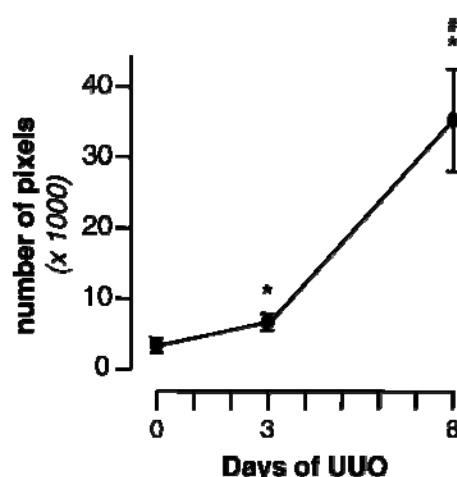


Figure 1. UUO induces tubulointerstitial fibrosis. Renal accumulation of fibronectin was quantified by immuno-histochemistry in mice before UUO (day 0) and after 3 days or 8 days of UUO. Data are expressed as means \pm SD from 5 mice. * $P < 0.05$ versus day 0, # $P < 0.05$ versus day 3.

study, PAI-1 inhibition was established before induction of the pathology. Yet in a clinical context, fibrosis is often detected at a late stage. Therefore the current study was designed to evaluate the effect of delayed PAI-1 blockade on the development of TIF. For this purpose, we used a mixture of small peptides mimicking parts of the protease domains of PAs, thereby serving as PAI-1 decoy molecules which prevent the PAI-induced inhibition of uPA and tPA (11). We explored the efficacy of decoys to reduce pre-installed fibrosis after UUO, a model encompassing the main features of the development of TIF (12).

Materials and Methods

PAI-1 Decoy. The decoy mixture was composed of two peptides: H-Arg-Asp-Glu-Lys-Thr-Gln-Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-OH and H-Asp-Arg-Arg-Leu-Thr-Trp-Glu-Tyr-OH (11), in a 50/50 ratio. Peptides were synthesized by GL Biochem (Shanghai, China) and had an average purity of 97% as assessed by HPLC analysis. Both peptides bound with the kringle-2 domain of PAI-1 and consequently prevented complex formation with tPA and uPA in a reversible manner (11).

Experimental Protocols. UUO was performed on pathogen free male ED-1 mice (8 weeks) by ligation of the left ureter as previously described (12, 13). To study the effect of delayed PAI-1 inhibition on TIF, the treatment with PAI-1 decoy peptide mix was initiated on day 3 of UUO by daily iv injection of decoy mixture (1 mg/kg/d). Eight days after UUO, mice were sacrificed and the kidneys were removed and sectioned into 4 parts for different analysis: histology (middle section), PAI-1, PAs and plasmin activities (1/2 of a kidney pole), MMPs activities (1/2 of a kidney pole) and HGF expression (kidney pole). To evaluate the level of fibrosis that exists after 3 days of

UUO, other mice were killed at 3 days after surgery and histological analysis of TIF was performed.

All experiments reported were conducted as stated in the National Institutes of Health, USPHS, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institution's Animal Care and Use Committee.

Immuno-Histochemistry Analysis. Parts of kidney were fixed in Carnoy's solution, dehydrated, embedded in paraffin and then sectioned at 3 μ m. Then they were subjected to evaluate interstitial fibrosis by immuno-histochemical staining collagen III, collagen IV and fibronectin for ECM detection, F4/80 for macrophages detection and α -smooth muscle actin (α -SMA) for myofibroblasts detection, as previously described (12, 13). Histomorphometric analyses were performed as previously described (12, 13).

PAI-1, PAs and Plasmin Activities. For protein extraction, parts of kidney were rapidly mixed with 150 μ l of ice-cold extraction buffer (13 mM sodium citrate, 0.33 M sodium acetate, pH 3.9) and were manually homogenized on ice for 10 sec using a potter device (Piston Pellet 1.5 ml, Treff AG, Switzerland) followed by centrifugation for 5 min at 12000 \times g at 4°C. Supernatant (100 μ l) was added to 5 μ l of 20% acetic acid, gently mixed and stored at -80°C for PAs and plasmin activities determination or it was directly stored at -80°C for PAI-1 activity. Protein concentrations were measured using a Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, France). After dilution (1/20) of samples in 0.9% of NaCl, PAs and PAI-1 activities were measured by chromogenic assay (101101 Spectrolyse®/Fibrin, Biopool Int., Sweden and BI101201 Spectrolyse (pl) PAI, Kordia, the Netherlands, respectively). Plasmin activity was determined using a highly selective chromogenic substrate for plasmin (S-2403, Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA, France).

MMP-2 and MMP-9 Activities. Renal proteins were extracted as described for PAI-1 activity excepted that the extraction buffer contained 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA. MMP-2 and MMP-9 activities were determined by zymography. For this, 20 μ l of samples were mixed with non-reducing SDS sample buffer and loaded onto 8–10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml of gelatin. After electrophoresis, gels were soaked 2 \times 20 min in 2.5% (vol/vol) of Triton X100 at room temperature and incubated overnight at 37°C in activation buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.25% (v/v) Triton X100, 5 mM CaCl₂ and 1 μ M ZnCl₂). Gels were then stained for 3 h with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in a mixture of methanol/acetic acid/water (50/10/40 v/v/v) and destained in the same mixture without Coomassie Brilliant Blue.

HGF Expression. Renal proteins were extracted as described for MMPs zymography excepted that the extraction buffer was supplemented with SDS (0.1%), NP-40 (1%), PMSF (0.36 mg/ml), aprotinin and leupeptin (10

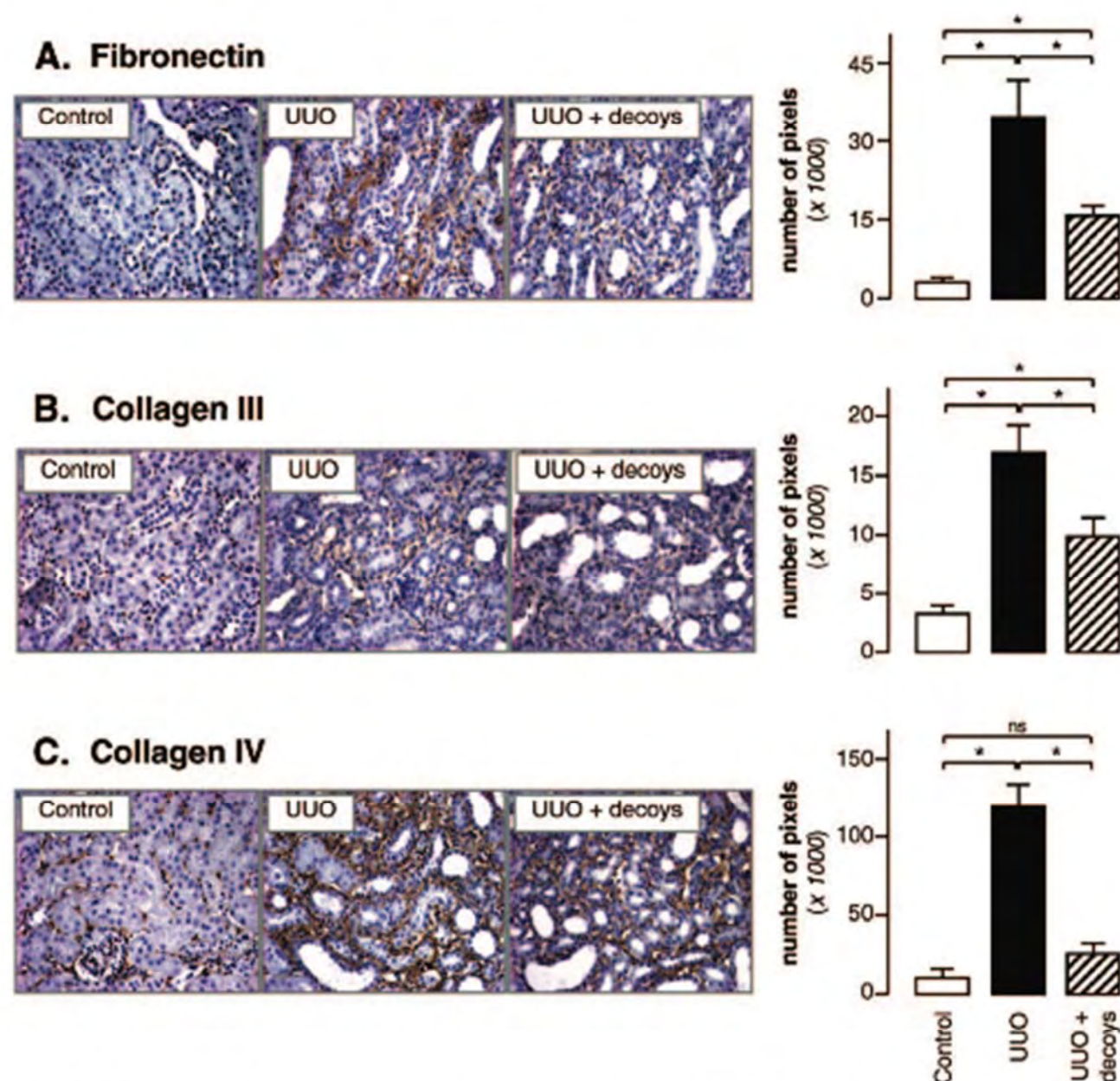


Figure 2. PAI-1 decoy peptides decrease ECM accumulation. Renal accumulation of fibronectin (A), collagen III (B) and collagen IV (C) was quantified by immuno-histochemistry in control mice (control) and in 8d-UUO mice treated (UUO + decoys) or not (UUO) by PAI-1 decoys. Data are expressed as means \pm SD from 5 mice and pictures display corresponding light micrographs. * $P < 0.05$, ns: not significant.

$\mu\text{g/ml}$). Then HGF expression was assayed in samples using immunoassay kit (DHG00, R&D Systems, MN, USA).

Statistical Analysis. All the data are expressed as mean \pm standard deviations (SD). Statistical analysis was performed using Prism software. One-Way ANOVA with Bonferroni *post-test* were performed for comparison between the different groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

PAI-1 Decoy Treatment Was Initiated at Day 3 of UUO, when TIF Is Already Detectable. The objective

of this study was to examine the efficacy of PAI-1 decoys to reduce UUO-induced pre-installed TIF. Consequently, to choose when to begin the administration of PAI-1 decoys, a time course of TIF appearance in the obstructed kidneys was first undertaken. TIF is characterized by ECM deposition which is the result of the elevated synthesis and decreased degradation of ECM compounds, including fibronectin. As presented in Figure 1, fibronectin accumulation increased in accordance with the duration of UUO. Moreover, renal fibronectin levels are slightly, but significantly, increased after 3 days of UUO. This result, with those from other laboratories (12, 14–19), demonstrates that 3 days of

PAI-1 DECOYS REDUCE TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS

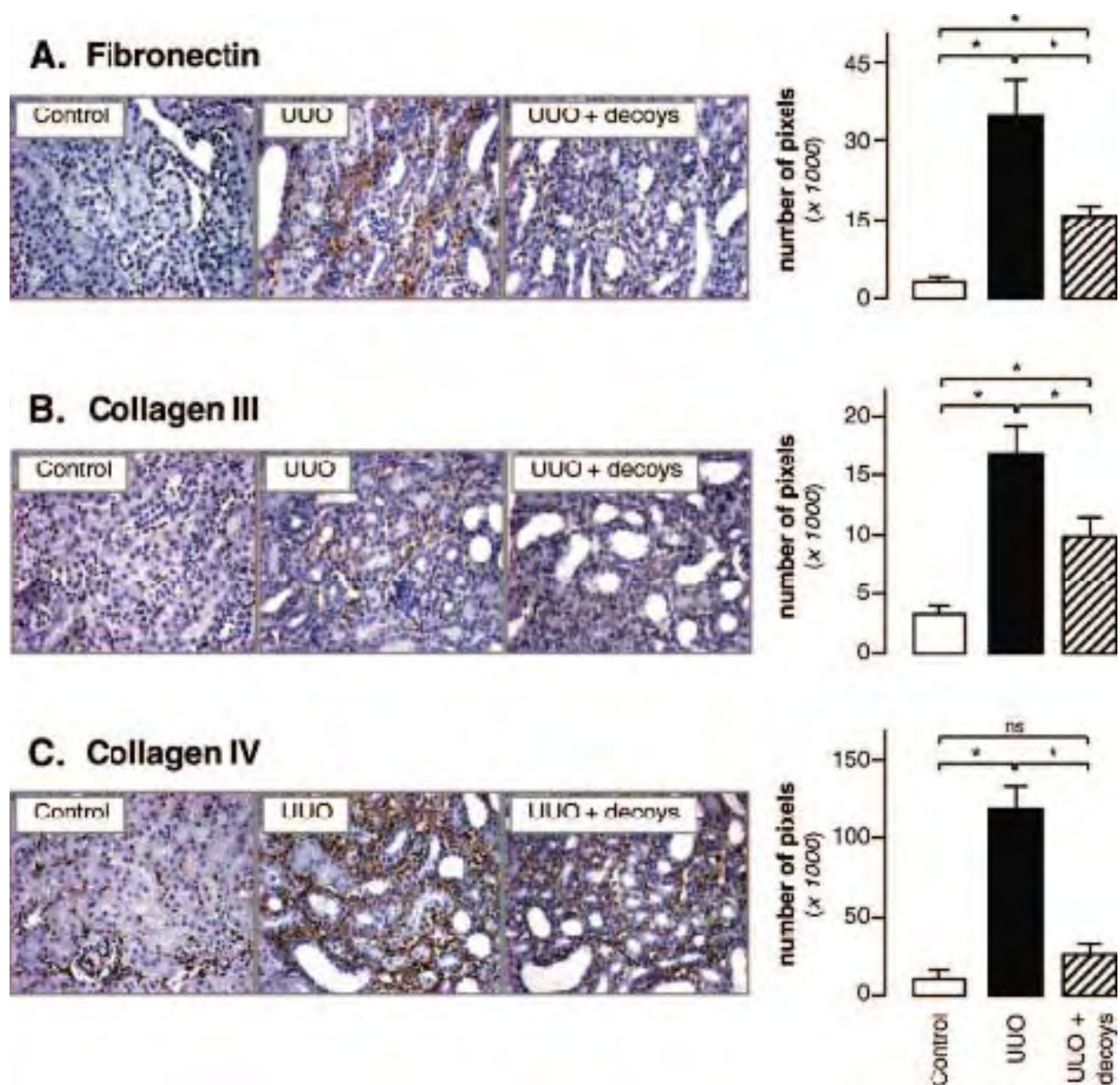


Figure 2. PAI-1 decoy peptides decrease ECM accumulation. Renal accumulation of fibronectin (A), collagen III (B), and collagen IV (C) was quantified by immunohistochemistry in control mice (control) and in 8d-UUO mice treated (UUO + decoys) or not (UUO) by PAI-1 decoys. Data are expressed as means \pm SD from 5 mice and pictures display corresponding light micrographs. * $P < 0.05$; ns, not significant.

$\mu\text{g/ml}$. Then HGF expression was assayed in samples using immunoblotting kit (DHRG, R&D Systems, MN, USA).

Statistical Analysis. All the data are expressed as mean \pm standard deviations (SD). Statistical analysis was performed using Prism software. One-Way ANOVA with Tukey's post-test were performed for comparison between the different groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

PAI-1 Decoy Treatment Was Initiated at Day 3 of UUO, when TIF Is Already Detectable. The objective

of this study was to examine the efficacy of PAI-1 decoys to reduce UUO-induced pre-installed TIF. Consequently, to choose when to begin the administration of PAI-1 decoys, a time course of TIF appearance in the obstructed kidney was first undertaken. TIF is characterized by ECM deposition which is the result of the elevated synthesis and decreased degradation of ECM compounds, including fibronectin. As presented in Figure 1, fibronectin accumulation increased in accordance with the duration of UUO. Moreover, renal fibronectin levels are slightly, but significantly, increased after 3 days of UUO. This result, with those from other laboratories [12, 14–16], demonstrates that 3 days of

PAI-1 DECOYS REDUCE TUBULINTERSTITIAL FIBROSIS

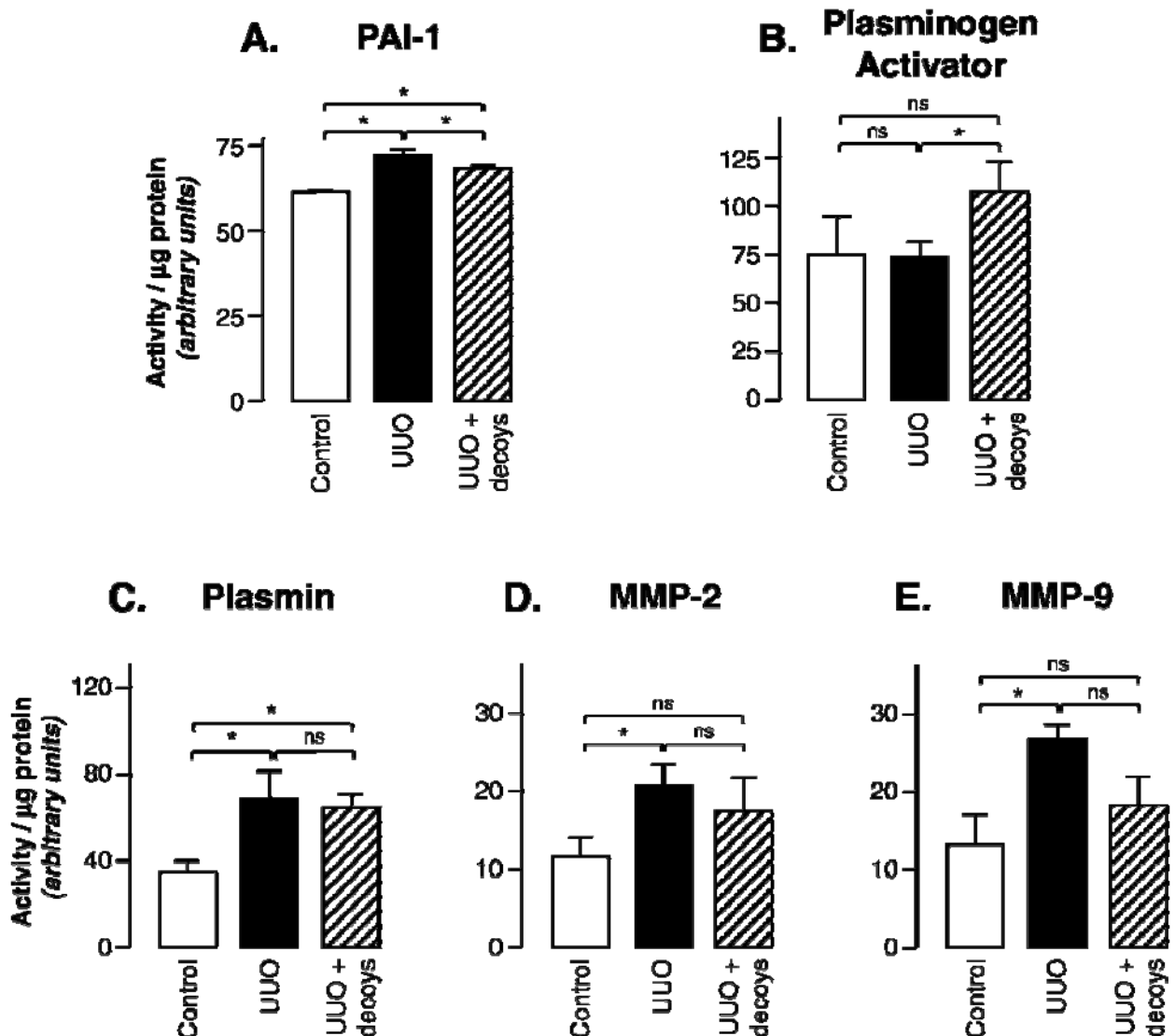


Figure 4. Effect of inhibition of PAI-1 on renal plasminogen system. Renal activity of PAI-1 (A), plasminogen activator (B), plasmin (C), MMP-2 (D) and MMP-9 (E) was measured in control mice (control) and in 8d-UUO mice treated (UUO+ decoys) or not (UUO) by PAI-1 decoys. Data are expressed as means \pm SD from 5 mice. * $P < 0.05$, ns: not significant.

studied the effect of PAI-1 decoy treatment on the activity of these enzymes. PAI-1 is normally not produced in healthy kidneys but its expression is strongly induced by ureteral obstruction (10). In addition, the enzymatic activities of tPA, uPA and plasmin are increased in UUO, despite a raise in PAI-1 (10). In our study, 8d-UUO stimulated PAI-1 and plasmin activities but did not change PAs activity (Fig. 4A–C). Since PAI-1 inhibits PAs and PAs activates plasmin, it might be expected that the treatment of UUO mice with PAI-1 decoys would result in an increase of PAs activity and in a more important increase of plasmin activity. As expected, PAI-1 activity was reduced (Fig. 4A) and PAs activity was stimulated (Fig. 4B) in UUO mice receiving decoys compared to UUO alone. However, the UUO-induced stimulation of plasmin activity was unaffected by decoy administration (Fig. 4C). These results suggest that

PAI-1 inhibition attenuated TIF by a mechanism depending mainly on PAs.

PAI-1 Inhibition Has No Effect on MMPs Activity. MMPs are a large family of matrix-degrading enzymes. Among them are MMP-2 and MMP-9, two gelatinases highly expressed in renal tissue that can be stimulated by PAs (20). In renal mesangial cells, uPA activates MMP-2 via membrane type 1-MMP, independently of plasmin (21). In addition, uPA-induced activation of MMP-9 in monocytes is partially blocked by PAI-1 activation but is not affected by plasmin inhibitors (20). Since PAI-1 decoys increased PAs activity without change in plasmin activity in UUO kidney, it is therefore possible that they also stimulated both MMP-2 and MMP-9. So we tested this hypothesis using gelatin zymography. As shown in Figure 4D–E, MMP-2 and MMP-9 activities were raised in 8d-UUO but they were not significantly modified by PAI-

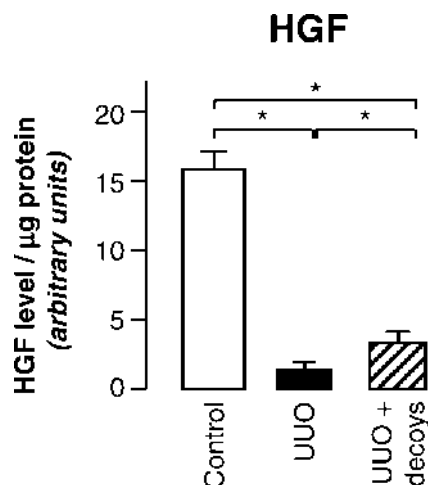


Figure 5. PAI-1 blockade partially restores HGF expression. Renal HGF expression was analyzed by ELISA in control mice (control), 8d-UUO mice (UUO) or UUO mice supplemented with PAI-1 decoys (UUO + decoys). Results represent the mean \pm SD from 5 experiments. * $P < 0.05$.

1 decoys administration. Thus, antifibrotic effect of delayed PAI-1 inhibition was independent of MMP-2 and MMP-9 activities.

HGF Protein Increases upon PAI-1 Decoy Administration. TGF- β plays an important role in ECM deposition and fibrotic changes. However, PAI-1 decoys administration did not modify TGF- β mRNA expression in UUO (data not shown), suggesting that another mediator accounts for the antifibrotic effect of decoy peptides. HGF is a putative candidate because i) HGF administration ameliorates TIF in UUO mice (22) and ii) activation of HGF is observed concomitantly with attenuation of fibrotic lesions in the liver of PAI-1 knockout mice with bile duct ligation (23). The involvement of HGF in protective effect of PAI-1 decoys was thus examined measuring its protein expression by ELISA. As presented in Figure 5, 8d-UUO caused a decrease in HGF expression and this effect was attenuated by PAI-1 decoys. Similar results were obtained with HGF immunoblot (not shown). Thus it is reasonable to think that part of the renal protective effect of delayed PAI-1 inhibition goes through increased HGF expression.

Discussion

In the current study we show that the delayed inhibition of PAI-1 by daily *i.v.* administration of a mixture of two small PAI-1 decoy peptides efficiently reduced UUO-induced TIF. This effect was obtained without modification of plasmin activity but accompanied by increased HGF level.

Early blockade of PAI-1 expression prevented the development of fibrosis in UUO and experimental glomerulonephritis (10, 24). However, the effects of a drug differ if administration begins before or after disease induction (25). Therefore, the current study is the first example showing that delayed inhibition of PAI-1 reduced established TIF.

This result is especially important in the context of renal disease which is often only detected at a later stage. In addition, it shows the feasibility of the use of small PAI-1 decoy peptides for antifibrotic treatment. The attenuation of UUO induced-TIF by PAI-1 decoys administration is accompanied by stimulation of PAs activity. This result contrasts with previous studies where uPA^{-/-} and tPA^{-/-} mice subjected to UUO had similar and lower TIF than normal mice, respectively (26). It can be explained by different experimental conditions since, in our study, the inhibition of PAI-1 was delayed and led to activation of both uPA and tPA.

PAI-1 decoys do not change the number of interstitial macrophages and myofibroblasts. This result contrasts with studies using PAI-1 knockouts (10) or transgenic PAI-1 overexpressing mice (14) and with experiments using a dominant negative PAI-1 (24). However, induction of TIF by PAI-1 involves early effects on interstitial cell recruitment while the more delayed effects are associated with decreased uPA activity (14). In addition, in the previous studies (10, 14), the expression of the entire PAI-1 molecule, and consequently related effects, are modified while only the PAI-1 ability to inhibit PAs is blocked in our study. PAI-1 can directly interact with other proteins such as vitronectin and low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) to regulate cellular adhesion and migration and have monocyte chemoattractant properties (6). These interactions being probably not modified by PAI-1 decoys might also explain the lack of effect on cell recruitment in our model.

Although PAI-1 decoy administration restored PAs activity, no effect on plasmin activity was observed. The absence of correlation between both activities has already been described in PAI-1^{-/-} or tPA^{-/-} mice subjected to UUO (10, 23). Therefore it is possible that the antifibrotic effects of PAI-1 decoys involve plasmin-independent pathways. The absence of effect of PAI-1 inhibition on renal MMP-2 and MMP-9 activities confirms this hypothesis. Other proteolytic activities of PAs can be proposed. First, increased PAI-1 decoys-induced PAs activity may be directly involved in proteolysis because some ECM proteins, such as fibronectin, are direct substrates of PAs (27). Second, increased PAs levels might activate MMPs other than MMP-2 and MMP-9. Indeed, PAs can activate membrane type 1-MMP (21) which digests collagen and fibronectin (28). Finally, it was shown that the uPA receptor (uPAR) can dimerize with other receptors including LRP, an endocytosis receptor for fibronectin (29). So it is not excluded that the decoys-induced increase of PAs activity stimulates the uPAR/LRP pathway of endocytosis, thus promoting decreased ECM expression.

Even if TGF- β plays an important role in fibrogenic mechanisms, we did not observe modification of expression of this profibrotic cytokine. TGF- β is therefore probably not involved in the beneficial effects of PAI-1 decoys administration. HGF is a renoprotective protein which delays the

progression of established TIF in the UUO model (16). Because PAI-1 decoys increased by 75% the HGF protein levels compared to non-treated UUO, their antifibrotic effect might also be mediated by HGF. How decoys treatment activated HGF was not investigated. However, *in vitro*, PAs can directly cleave pro-HGF into HGF (30). In addition, renal HGF expression decreased after UUO in uPAR knockout mice, independently of plasminogen (31). So PAI-1 decoy peptides could increase HGF levels by a mechanism dependent on PAs and uPAR. It is possible that decoys increase uPAR expression at cell surface. Indeed, PAI-1 can bind to uPAR-bound uPA and the ternary uPAR/uPA/PAI-1 complex is known to rapidly associate with LRP to be internalized (6). As PAI-1 decoys prevent interaction between PAI-1 and PAs, they may block the intracellular sequestration of the uPAR/uPA/PAI-1 complex, leading therefore to maintain uPAR at cell surface and thus increase PAs activity.

In conclusion, we have shown the efficacy/feasibility to use small peptides inhibiting PAI-1 activity to slow down the progression of tubulointerstitial fibrosis after induction of the pathology. This is a situation more realistic than treatment before initiation of the pathology as it resembles more to what occurs in a clinical setting. Although the exact mechanism is not clear, HGF activation might be responsible for the antifibrotic effects of PAI-1 decoys.

1. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 365:331–340, 2005.
2. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Pirfenidone treatment decreases transforming growth factor-beta1 and matrix proteins and ameliorates fibrosis in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant* 2:111–119, 2002.
3. Ng YY, Chen YM, Tsai TJ, Lan XR, Yang WC, Lan HY. Pentoxifylline inhibits transforming growth factor-beta signaling and renal fibrosis in experimental crescentic glomerulonephritis in rats. *Am J Nephrol* 29:43–53, 2009.
4. Wu Y, Wu G, Qi X, Lin H, Qian H, Shen J, Lin S. Protein kinase C beta inhibitor LY333531 attenuates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemotactic protein-1 expression in the kidney in diabetic rats. *J Pharmacol Sci* 101:335–343, 2006.
5. Chung BH, Li C, Sun BK, Lim SW, Ahn KO, Yang JH, Choi YH, Yoon KH, Sugawara A, Ito S, Kim J, Yang CW. Rosiglitazone protects against cyclosporine-induced pancreatic and renal injury in rats. *Am J Transplant* 5:1856–1867, 2005.
6. Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 17:2999–3012, 2006.
7. Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res* 41:4629–4636, 1981.
8. Mackay AR, Corbitt RH, Hartzler JL, Thorgeirsson UP. Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases. *Cancer Res* 50:5997–6001, 1990.
9. Nagase H, Suzuki K, Enghild JJ, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1 (tissue

- collagenase) and 3 (stromelysin). *Biomed Biochim Acta* 50:749–754, 1991.
10. Oda T, Jung YO, Kim HS, Cai X, Lopez-Guisa JM, Ikeda Y, Eddy AA. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 60:587–596, 2001.
11. Mimuro J, Kaneko M, Murakami T, Matsuda M, Sakata Y. Reversible interactions between plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biochim Biophys Acta* 1160:325–334, 1992.
12. Klein J, Gonzalez J, Duchene J, Esposito L, Pradere JP, Neau E, Delage C, Calise D, Ahluwalia A, Carayon P, Pesquero JB, Bader M, Schanstra JP, Bascands JL. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J*, 2008.
13. Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, Pecher C, Bader M, Girolami JP, Bascands JL. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest* 110:371–379, 2002.
14. Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X, Okamura DM, Alpers CE, Bumgarner RE, Peters MA, Zhang G, Eddy AA. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int* 67:2221–2238, 2005.
15. Zhang G, Kernan KA, Collins SJ, Cai X, Lopez-Guisa JM, Degen JL, Shvil Y, Eddy AA. Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol* 18:846–859, 2007.
16. Yang J, Liu Y. Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F349–357, 2003.
17. Kawai T, Masaki T, Doi S, Arakawa T, Yokoyama Y, Doi T, Kohno N, Yorioka N. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest* 89:47–58, 2009.
18. Kassiri Z, Oudit GY, Kandam V, Awad A, Wang X, Ziou X, Maeda N, Herzenberg AM, Scholey JW. Loss of TIMP3 enhances interstitial nephritis and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 2009.
19. Hewitson TD, Mookerjee I, Masterson R, Zhao C, Tregear GW, Becker GJ, Samuel CS. Endogenous relaxin is a naturally occurring modulator of experimental renal tubulointerstitial fibrosis. *Endocrinology* 148:660–669, 2007.
20. Menshikov M, Elizavova E, Plakida K, Timofeeva A, Khaspekov G, Beabekashvili R, Bobik A, Tkachuk V. Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes via gene transcription and protein synthesis. *Biochem J* 367:833–839, 2002.
21. Kazes I, Delarue F, Hagege J, Bouzahir-Sima L, Rondeau E, Sraer JD, Nguyen G. Soluble latent membrane-type 1 matrix metalloprotease secreted by human mesangial cells is activated by urokinase. *Kidney Int* 54:1976–1984, 1998.
22. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 59:1304–1314, 2001.
23. Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO. PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Lett* 581:3098–3104, 2007.
24. Huang Y, Haraguchi M, Lawrence DA, Border WA, Yu L, Noble NA. A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 112:379–388, 2003.
25. Lutz J, Yao Y, Song E, Antus B, Hamar P, Liu S, Heemann U. Inhibition of matrix metalloproteinases during chronic allograft nephropathy in rats. *Transplantation* 79:655–661, 2005.
26. Yamaguchi I, Lopez-Guisa JM, Cai X, Collins SJ, Okamura DM, Eddy AA. Endogenous urokinase lacks antifibrotic activity during progressive renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F12–19, 2007.
27. Gold LI, Schwimmer R, Quigley JP. Human plasma fibronectin as a substrate for human urokinase. *Biochem J* 262:529–534, 1989.

21

22

28. Barbolina MV, Stack MS. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. *Semin Cell Dev Biol* 19: 24–33, 2008.
29. Salicioni AM, Mizelle KS, Loukinova E, Mikhailenko I, Strickland DK, Gonias SL. The low density lipoprotein receptor-related protein mediates fibronectin catabolism and inhibits fibronectin accumulation on cell surfaces. *J Biol Chem* 277:16160–16166, 2002.
30. Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM. Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* 270:603–611, 1995.
31. Zhang G, Kim H, Cai X, Lopez-Guisa JM, Alpers CE, Liu Y, Carmeliet P, Eddy AA. Urokinase receptor deficiency accelerates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:1254–1271, 2003.

Conclusion

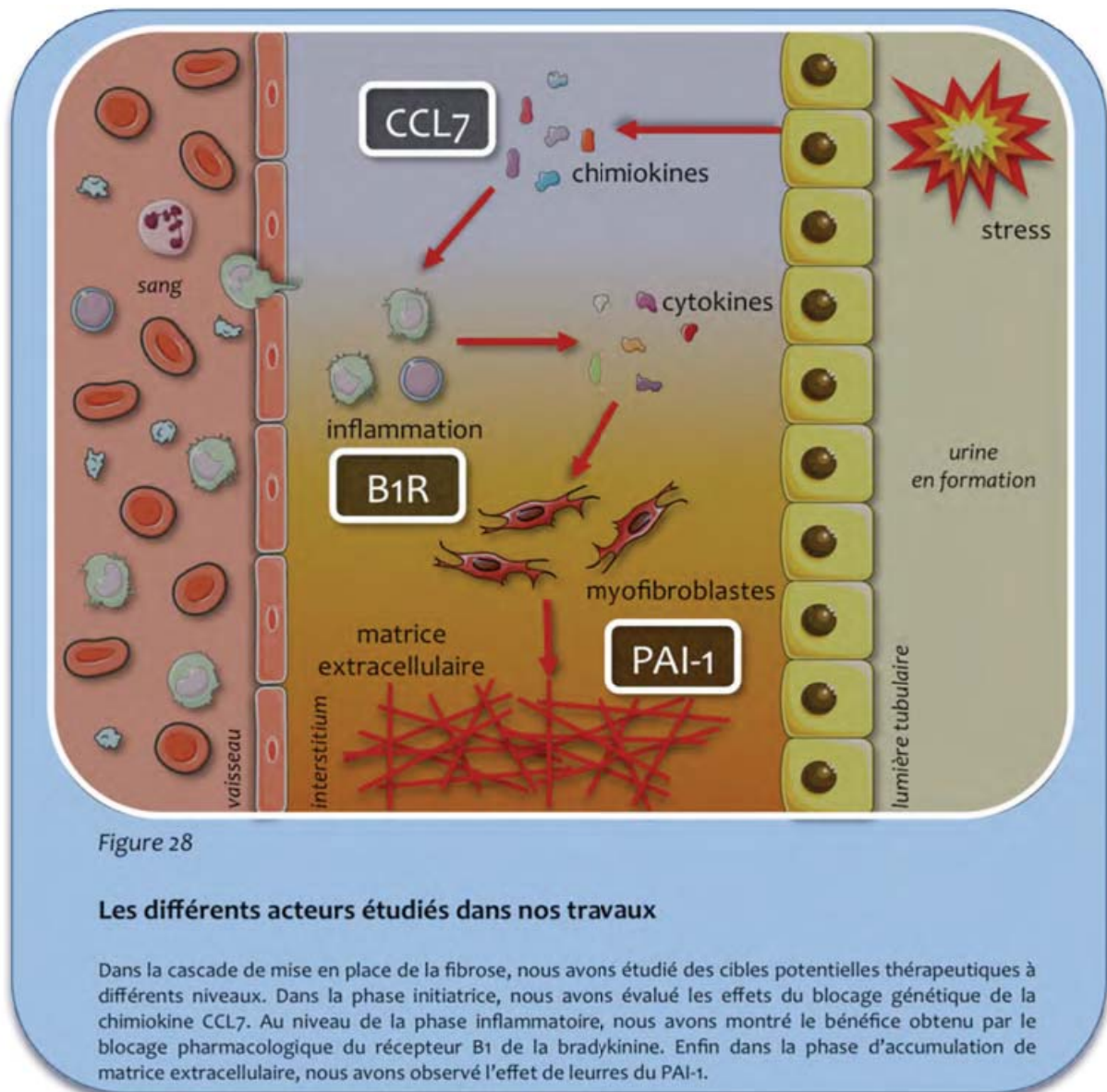
*"Mais qui a décidé qu'il fallait mettre une citation
à chaque titre de chapitre ??? !!!"*

Moi
(un soir à 2 heures du matin en recherche d'inspiration...)

La fonction des reins est primordiale pour le maintien de l'équilibre de l'organisme. De nombreuses pathologies affectent les reins et ont pour conséquence une perte de cette fonction. Il est maintenant reconnu que cette perte de fonction est surtout corrélée à l'apparition d'une fibrose tubulointerstitielle (FTI) localisée dans l'espace bordant les tubules rénaux. Cette fibrose caractérisée par une accumulation exagérée de la matrice extracellulaire se décompose en trois étapes. L'inflammation initiale conduit à l'apparition d'un nouveau type cellulaire appelé myofibroblastes, responsable de l'accumulation de protéines matricielles. Les traitements actuels dirigés principalement contre le système rénine/angiotensine permettent de contenir la progression de la pathologie sans pour autant la bloquer. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est donc de première importance pour la prise en charge de ces néphropathies.

Réguler la phase inflammatoire initiatrice permettrait de bloquer l'activation des phases qui en découlent et ainsi éviter la progression de la pathologie. Les chimiokines sont une classe de protéines aux propriétés chimiotactiques permettant le recrutement des cellules immunitaires du sang vers les tissus. Elles sont donc les premiers acteurs de l'inflammation. Le système des chimiokines est composé d'une cinquantaine de ligands répartis en quatre familles (CCL, CXCL, CL et CX₃CL) et d'une vingtaine de récepteurs (CXCR, CCR, CR et CX₃CR) ayant des effets spécifiques à certains types cellulaires. La famille des chimiokines CCL est orientée majoritairement vers le recrutement des monocytes or l'inflammation rénale chronique se caractérise par un influx important de cellules monocytaires. Ainsi l'étude de cette famille de chimiokine dans le rein semblait évidente. Parmi tous les membres de cette famille, nous nous sommes intéressés à la chimiokine CCL7. Cette chimiokine est agoniste des récepteurs CCR1, CCR2 et CCR3, et est antagoniste du récepteur CCR5. Dans un modèle de fibrose induite par obstruction urétérale unilatérale (OUU), le blocage de CCL7 conduit à une réduction de la fibrose à 3 et 8 jours après induction de la pathologie par des mécanismes potentiellement différents. Alors qu'à 3 jours après OUU, on observe une réduction de l'inflammation et de la fibrose qui en découle, à 8 jours, le blocage de CCL7 est sans effet sur le nombre de cellules infiltrées mais diminue l'expression de la cytokine profibrosante, CTGF, et de la protéine matricielle, le collagène de type I. Cet effet tardif est confirmé par des études *in vitro* sur des cellules épithéliales tubulaires humaines sur lesquelles, le traitement par CCL7 induit précocément l'expression du CTGF et du TGFβ puis plus tardivement

l'expression du collgène de type I. Enfin, il semblerait qu'à 8 jours post-OUU, le blocage de CCL7 augmente le recrutement des lymphocytes T régulateurs. L'étude de CCL7 pourra être poursuivie et affinée par l'utilisation de formes tronquées ou mutées de CCL7, ayant des caractéristiques de dominant-négatif. En effet, l'administration par voie sanguine ou par mini-pompe directement dans l'artère rénale de ces mutants serait une première approche pharmacologique pour évaluer le potentiel thérapeutique de CCL7.



Dans l'optique de mieux comprendre cette phase inflammatoire, nous nous sommes également intéressés au récepteur B1 (RB1) de la bradykinine. Ce récepteur n'a pas d'expression constitutive mais est surexprimé en conditions inflammatoires faisant de lui une cible thérapeutique idéale. Nous avons montré que le blocage génétique ou pharmacologique du RB1 dans le modèle d'OUU diminuait l'accumulation de protéines

matricielles. Les néphropathies n'étant traitées qu'à des stades avancés, nous avons évalué le potentiel d'un traitement antagoniste sur une fibrose déjà installée dans les modèles d'OUU et de glomérulonéphrite induite par sérum néphrotoxique. Là encore, on observe un bénéfice important sur l'apparition de la FTI. Enfin, l'analyse de biopsies humaines a montré que l'expression de ce récepteur était corrélée à l'état inflammatoire du tissu.

Chronologiquement, les études sur le récepteur B1 ont été menées avant celles sur CCL7. Ainsi nous avons pu montrer que la stimulation du RB1 par son ligand induit l'expression de chimiokines, dont CCL7. Afin d'affiner la mécanistique, nous avons voulu voir si CCL7 était un effecteur de la fibrose en aval de l'activation du RB1. Ainsi l'analyse conjointe de ces trois études laisse penser que les effets du blocage génétique de CCL7 peuvent expliquer, au moins en partie, les effets de celui du RB1. Les bénéfices de l'inhibition du RB1 étant supérieurs à ceux de l'inhibition de CCL7, CCL7 ne serait pas la seule protéine délétère induite par la stimulation du RB1.

Ces études sur le RB1 et CCL7 confirment que la réduction de l'inflammation peut être une stratégie intéressante pour le traitement des néphropathies. Toutefois, l'inflammation a aussi des effets bénéfiques dans le développement de la FTI et bloquer l'apparition de la fibrose dans les stades plus tardifs pourrait également avoir des effets protecteurs. Le système du plasminogène est composé de protéines ayant des rôles dans la dégradation des protéines matricielles. Un des inhibiteurs de ce système est le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Dans notre dernière étude, nous avons administré 3 jours après OUU à des souris des leurres du PAI-1 et observé leurs effets sur la fibrose. Ces leurres sont capables de diminuer fortement l'accumulation de matrice extracellulaire. Ces effets semblent indépendants d'une réactivation du système du plasminogène mais pourraient être dus à l'augmentation de l'expression de la cytokine antifibrosante, l'hepatocyte growth factor (HGF).

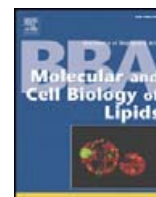
Tous ces travaux mettent en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des pathologies rénales (figure 28). Les pathologies fibrosantes sont, comme nous l'avons vu, multifactorielles. Il y a fort à parier que des approches monothérapeutiques ne seront pas suffisantes pour en bloquer la progression. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques permettra une approche multithérapeutique visant à bloquer le développement de la FTI à différents niveaux de

son apparition (inflammation, apparition et activation des myofibroblastes, synthèse de protéines matricielles). Dans le cadre de nos études, il serait intéressant de regarder les effets du blocage simultané de CCL7, du RB1 et du PAI-1. N'agissant pas sur les mêmes étapes et ne modifiant pas les mêmes paramètres ou protéines, l'inhibition de ces trois protéines pourrait avoir des effets synergiques.

Bien sûr, il sera important dans les années à venir de développer de nouvelles molécules antifibrosantes afin de traiter toutes ces pathologies, cependant, il est évident qu'il est beaucoup plus difficile de réverser une fibrose déjà bien installée que de bloquer la progression d'une fibrose débutante. Pour cela, la détection précoce de ces pathologies est un enjeu majeur. Dans l'équipe, des études de protéomique urinaire sont à la recherche de marqueurs précoces des différentes pathologies rénales. Cette méthode non invasive permettrait de diagnostiquer à large échelle et de façon répétée des néphropathies. De la même façon que les campagnes du dépistage des cancers du sein ou de la prostate, il paraîtrait intéressant de réaliser des campagnes de dépistage de néphropathies par simple analyse d'urine. Dans le futur, le dépistage précoce couplé à la découverte de nouvelles molécules curatives permettront une meilleure prise en charge des patients et une diminution du nombre d'insuffisants rénaux terminaux qui n'ont d'autres alternatives que la dialyse ou la transplantation.

Annexes

"kiss a Wookiee; kick a droid..."
Corey Vidal, John Williams is the man
(et bientôt Enora, dès qu'elle parlera !!!)



Review

Lysophosphatidic acid and renal fibrosis

Jean-Philippe Pradère^{a,b}, Julien Gonzalez^{b,c}, Julie Klein^{b,c}, Philippe Valet^{a,b}, Sandra Grès^{a,b}, David Salant^d, Jean-Loup Bascands^{b,c}, Jean-Sébastien Saulnier-Blache^{a,b}, Joost P. Schanstra^{b,c,*}

^a Inserm, U858/I2MR, Department of Metabolism and Obesity, Team #3, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

^b Université Toulouse III Paul Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, F-31000 Toulouse, France

^c Inserm, U858/I2MR, Department of Renal and Cardiac remodelling, Team #5, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

^d Department of Medicine, Evans Biomedical Research Center, Boston University Medical Center, Boston, MA 02118, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2008

Received in revised form 1 April 2008

Accepted 1 April 2008

Available online 11 April 2008

Keywords:

Kidney

Fibrosis

Lysophosphatidic acid

Receptor

ABSTRACT

The development of fibrosis involves a multitude of events and molecules. Until now the majority of these molecules were found to be proteins or peptides. But recent data show significant involvement of the phospholipid lysophosphatidic acid (LPA) in the development of pulmonary, liver and renal fibrosis. The latest data on the role of LPA and the G-protein-coupled LPA₁ receptor in the development of renal fibrosis will be discussed. LPA₁-receptor activation was found to be associated with increased vascular leakage and increased fibroblast recruitment in pulmonary fibrosis. Furthermore, in renal fibrosis LPA₁-receptor activation stimulates macrophage recruitment and connective tissue growth factor expression. The observations make this receptor an interesting alternative and new therapeutic target in fibrotic diseases.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Renal fibrosis

Renal fibrosis is the principal process involved in the progression of chronic kidney disease (CKD) to end-stage renal disease (ESRD). As the incidence of ESRD continues to increase throughout the world, research to better understand the development of renal fibrosis has intensified [1,2]. The development of renal fibrosis involves the progressive appearance of glomerulosclerosis, tubulointerstitial fibrosis (TIF) and changes in renal vasculature (loss of glomerular and peritubular capillaries). On a molecular level, fibrosis can be defined as an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM), such as collagens and fibronectins. The presence of TIF, compared to glomerular sclerosis, has been strongly correlated to evolution to ESRD [1,3]. The first step in the development of TIF is inflammation associated with infiltration of macrophages, lymphocytes, and an increase in cytokine and chemokine secretion (Fig. 1). This inflammatory state induces a disequilibrium between apoptosis and proliferation of tubular cells, as well as accumulation of myofibroblasts. Myofibroblasts arise from epithelial mesenchymal transition, from proliferation/activation of the few resident fibroblasts or from infiltrated cells [1,4]. These myofibroblasts are the main cell type responsible for the secretion of the ECM.

As these events occur, the quantity of fibrotic tissue increases, causing a steady decline of renal function until eventually the kid-

ney is no longer able to function and organ failure occurs. In the past a number of mediators of TIF have been identified including chemokines, cytokines and growth factors [5]. Among these, transforming growth factor (TGF)β is thought to be the most fibrogenic, directly or indirectly, through the action of connective tissue growth factor (CTGF) [6].

As most renal disease convert sooner or later to renal fibrosis, treatment aiming to slowdown, halt, or even better, reverse renal fibrosis will have an enormous impact in renal disease. The multitude of events and factors [5] involved in the development of renal fibrosis is reflected by the increasing number of experimental reports showing the potential anti-fibrotic effect of a number of strategies and compounds [2,3]. However, the only currently clinically available drugs which have shown to slow down the progression towards ESRD are the inhibitors of the renin angiotensin system (RAS, [1]). Unfortunately, even when treated with RAS inhibitors CKD continues to progress. Alternative molecules or therapies are thus necessary [2,3].

2. Phospholipids and fibrosis

For the majority of organs and tissues the development of fibrosis involves a multitude of events and factors [7], similar to what was described above for the kidney. Until now, the majority of these molecules were found to be proteins or peptides (profibrotic cytokines, chemokines, metalloproteinases etc... [7]). But more recent data show significant involvement of phospholipids in wound healing [8] and in the development of fibrosis. These phospholipids include platelet activating factor (PAF), phosphatidyl choline and lysophosphatidic acid (LPA). Involvement

* Corresponding author. Université Toulouse III Paul Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, F-31000 Toulouse, France. Tel.: +33 5 61 32 37 48; fax: +33 5 62 17 25 54.

E-mail address: joost-peter.schanstra@toulouse.inserm.fr (J.P. Schanstra).

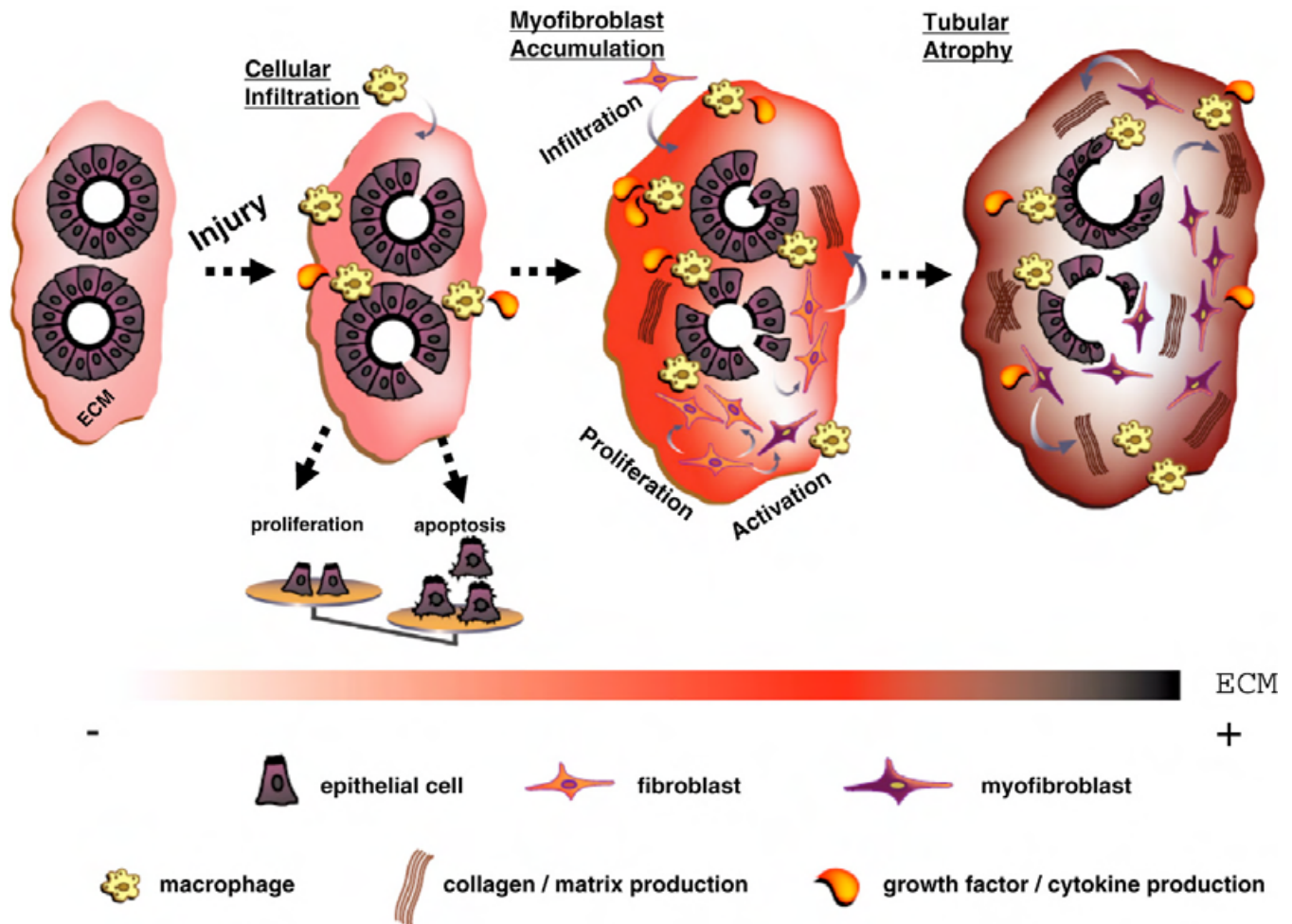


Fig. 1. Overview of the different stages in the development of renal fibrosis: the development of fibrosis in CKD is comparable between the different renal compartments [1]. For clarity the development of only renal TIF is shown. The first step in the development of TIF is renal inflammation. This is leading to infiltration of macrophages, lymphocytes, and to increased cytokine and chemokine secretion. This inflammatory state induces a disequilibrium between apoptosis and proliferation of tubular cells, as well as accumulation of myofibroblasts. These myofibroblasts are the main cell type responsible for the secretion of the ECM. As CKD progresses, ECM deposition becomes massive and uncontrolled apoptosis of tubular cells leads to tubular atrophy. This figure was adapted from [4], with permission.

of these three phospholipids in the development of fibrosis in various organs will be presented below, with a particular emphasis on LPA.

In vitro studies show PAF as an important actor in the development of renal tubulointerstitial fibrosis. PAF induces the production of the ECM-components collagen type I and IV and fibronectin by rat fibroblasts and tubular cells [9]. PAF also induces the production of the profibrotic cytokine TGF β [10]. *In vivo*, genetic ablation or pharmacological blockade of the PAF receptor induces a significant decrease of folic acid-induced renal fibrosis in rodent models [11]. Furthermore, PAF is also involved in pulmonary fibrosis as administration of a PAF receptor antagonist attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [12].

Other phospholipids are associated with the progression of pulmonary fibrosis. Different studies describe an increase of phospholipid concentrations in the bronchoalveolar lavage fluid and in particular phosphatidylcholine (PC) in rabbits and rodents injected with bleomycin [13,14]. The production of PC under these conditions might be beneficial as it was shown that dilinoleoylphosphatidylcholine *in vitro* and *in vivo*, induces a significant reduction in the expression of genes coding for ECM molecules and inflammatory mediators during bile duct ligation-induced liver fibrosis [15].

3. LPA and fibrosis

LPA is a growth factor-like phospholipid known to regulate several cellular processes including cell motility, cell proliferation, cell

survival, and cellular differentiation. LPA acts on specific G-protein coupled receptors (LPA₁ to LPA₅) [16]. Pharmacological tools to study the involvement of these different LPA receptors have been limited. Currently, the most frequently used pharmacological agent is Ki16425 that has been shown to block LPA₁- and LPA₃-receptor subtypes both *in vitro* [17] and *in vivo* [18]. Mice invalidated for the LPA-receptor subtype 1, 2 and 3 are also available [19–21]. Among the different bioactive phospholipids, lysophosphatidic acid (LPA) has been associated with the etiology of a growing number of disorders [22]. Furthermore, a number of studies suggest a role for LPA in the development of fibrosis (see the discussion below).

A number of muscular dystrophies are characterized by a progressive weakness and wasting of musculature, and by extensive fibrosis. It has been shown that LPA treatment of cultured myoblasts induced significant expression of connective tissue growth factor (CTGF). CTGF subsequently induces collagen, fibronectin and integrin expression and induces dedifferentiation of these myoblasts [23]. This example is introducing the unambiguous link between LPA and CTGF; it has been shown that treatment of a variety of cell types with LPA induces reproducible and high level induction of CTGF [24–32], although not necessarily in cells directly involved in the fibrotic process. CTGF is an important profibrotic cytokine, signaling down-stream and in parallel with TGF β [33]. In this context CTGF expression by gingival epithelial cells, which are involved in the development of gingival fibromatosis, was found to be exacerbated by LPA treatment [34].

LPA might also be associated with the progression of liver fibrosis. *In vitro*, LPA induces stellate cell and hepatocyte proliferation [35]. These activated cells are the main cell type responsible for the accumulation of ECM in the liver [36]. Furthermore, LPA plasma levels rise during CCl₄-induced liver fibrosis in rodents, or in hepatitis C virus-induced liver fibrosis in human [37,38].

In addition it was recently shown, in an elegant study of Tager et al., that LPA is an important protagonist in the evolution of pulmonary fibrosis [39]. They first showed that LPA is detected in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and that its concentration is significantly increased in BAL of bleomycin-challenged mice. In the next step it was shown that genetic ablation (LPA₁-receptor knockout mice) or pharmacological knockdown (Ki16425) of the LPA₁ receptor reduced bleomycin-induced pulmonary fibrosis and increased animal survival. Complementary studies further demonstrated that profibrotic effects of LPA₁-receptor stimulation might be explained by LPA₁-receptor-mediated vascular leakage and increased fibroblast recruitment, both profibrotic events. Finally, in human pulmonary fibrosis it was shown that LPA and the LPA₁ receptor also play an important role. The LPA₁ receptor was the LPA receptor most highly expressed on fibroblast obtained from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Furthermore, BAL obtained from IPF patients induced chemotaxis of human foetal lung fibroblasts that was blocked by the LPA₁-receptor antagonist Ki16425 [39]. Taken together these studies show that the LPA₁ receptor is a potential target in treatment of IPF. Unfortunately the role of CTGF in this pulmonary profibrotic action of LPA was not studied [39].

Finally, we have recently identified a role for LPA and the LPA₁ receptor in the development of renal fibrosis which will be discussed in detail below after a more general state of the art of the knowledge of LPA and its role in renal pathophysiology.

4. LPA and renal pathophysiology

4.1. *In vivo*

Only little information is available on the *in vivo* involvement of LPA in renal disease. LPA was shown to attenuate lesions induced by ischemia/reperfusion (I/R) in mice by inhibition of caspase-dependent apoptosis in tubular cells and reduced complement activation and neutrophil recruitment [40]. However, this protective role of LPA in I/R injury has been contested since the use of the LPA₃-receptor antagonist (VPC12249) induced a significant decrease in, and the use of a LPA analogue (OMPT) enhanced, the lesions induced by I/R [41]. Further studies are necessary to better define the role of LPA and its receptors in renal I/R injury. Other studies on patients with chronic renal failure have shown the presence of increased LPA concentrations in plasma [42,43]. These studies showed that in 18 dialyzed patients with renal failure, plasma LPA levels were 3-fold higher in dialyzed patients than in controls (respectively 1.41 ± 0.16 nmol/mL and 0.54 ± 0.08 nmol/mL). These data suggest an abnormal LPA metabolism with renal failure, but the cause and consequences of elevated LPA levels under these conditions remains to be clarified [42]. As the renal expression of LPA receptors is relatively high (especially LPA_{1/2} and LPA₃ receptors, [31,41]), this organ might be targeted by these high plasma LPA concentrations.

4.2. *In vitro*

Separately from these *in vivo* experiments, the expression of LPA receptors and the effects of LPA treatment on a variety of renal cell types were studied. It seems that, *in vitro*, LPA can induce biological effects on the majority of the kidney cell types: mesangial cells, renal tubular cells or renal fibroblasts.

4.2.1. Mesangial cells

(For review [44]): Mesangial cells are an important cell type in the glomerulus, which is the filtration unit of the kidney. Mesangial

cell activation (exemplified by mesangial profibrotic chemokine and cytokine secretion) and proliferation was identified in a number of renal pathologies [1]. LPA induces mesangial cell proliferation via mitogen-activated protein (MAP) kinase activation, contractility mediated by intra-cellular calcium mobilization, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) accumulation, and prostaglandin E₂ synthesis [45–47]. LPA can also be a mesangial cell survival factor, effects that are mediated by the Pi3k/Akt pathway [48]. Finally, LPA induces CTGF production by human mesangial cells [49]. With this large variety of biological responses on mesangial cells, it is most likely that LPA is an important actor in glomerular pathologies.

4.2.2. Proximal tubular cells

LPA induces tubular cell proliferation mediated by Pi3k/MAP kinase pathway activation and can inhibit serum starvation-induced apoptosis via the Pi3k/Akt pathway in primary culture of human tubular cells [45,50]. LPA is also able to induce intra-cellular calcium mobilization in opossum kidney proximal tubule cells [51]. This increase might be the onset of NHE3 channel translocation and activation in the apical membrane of tubular cells, consequently inducing Na⁺⁺ absorption [52,53]. Finally, it was shown that primary culture human proximal tubular cells express the LPA₁ receptor [54].

4.2.3. Renal fibroblasts

LPA can induce CTGF expression and secretion, which is mediated by small GTPase Rho activation [29].

5. LPA and renal fibrosis

Both *in vitro* and *in vivo*, LPA can mediate a number of processes involved in fibrosis and renal pathology. However, clear evidence for the involvement of LPA in the development of renal fibrosis has never been demonstrated. Incrimination of LPA and/or one of its receptors could lead to the proposition of new therapeutic agents for the treatment of renal fibrosis that are currently scarce [2]. We have therefore studied LPA and its receptors in an animal model of renal fibrosis: unilateral ureteral obstruction (UUO). This model mimics in an accelerated manner the development of renal fibrosis including renal inflammation, fibroblast activation and accumulation of extracellular matrix in the tubulointerstitium (Fig. 1, [4]). The results of this study are summarized in Fig. 2 and described below (details of this study can be found in [31]).

Confirming a previous report [41], we found that renal LPA receptors are expressed under basal conditions with an expression order of LPA₂ > LPA₃ = LPA₁ >> LPA₄ (Fig. 2a). UUO significantly induced LPA₁-receptor expression while the expression of the three other LPA receptors remained stable, except for a small, but significant decrease, in expression of the LPA₃ receptor. This was paralleled by renal LPA production (3.3 fold increase) in conditioned media from kidney explants (Fig. 2b). Contro-lateral kidneys exhibited no significant changes in LPA release and LPA-receptors expression. This shows that a prerequisite for an action of LPA in fibrosis is met: production of a ligand (LPA) and induction of one of its receptors (the LPA₁ receptor). In order to determine whether this induction plays a role in the development of renal fibrosis, UUO-induced renal TIF was compared between mice invalidated for the LPA₁ receptor (LPA₁ ^{-/-}) and wild type mice (LPA₁ ^{+/+}) [19,55]. Interestingly, the development of renal fibrosis was significantly attenuated in LPA₁ ^{-/-} mice (Fig. 2c). This genetic invalidation was confirmed upon the use of the LPA₁-receptor antagonist Ki16425 [17,18]. UUO mice treated with this antagonist closely resembled the LPA₁ ^{-/-} mice (Fig. 2c). These observations clearly demonstrated the crucial involvement of LPA and its receptor LPA₁ in the etiology of kidney fibrosis [31]. However, the contribution of the different renal cells in this profibrotic effect was less clear.

Since UUO-induced fibrosis is essentially interstitial, without visible glomerular lesions [56,57], the glomerular (mesangial cell) LPA₁

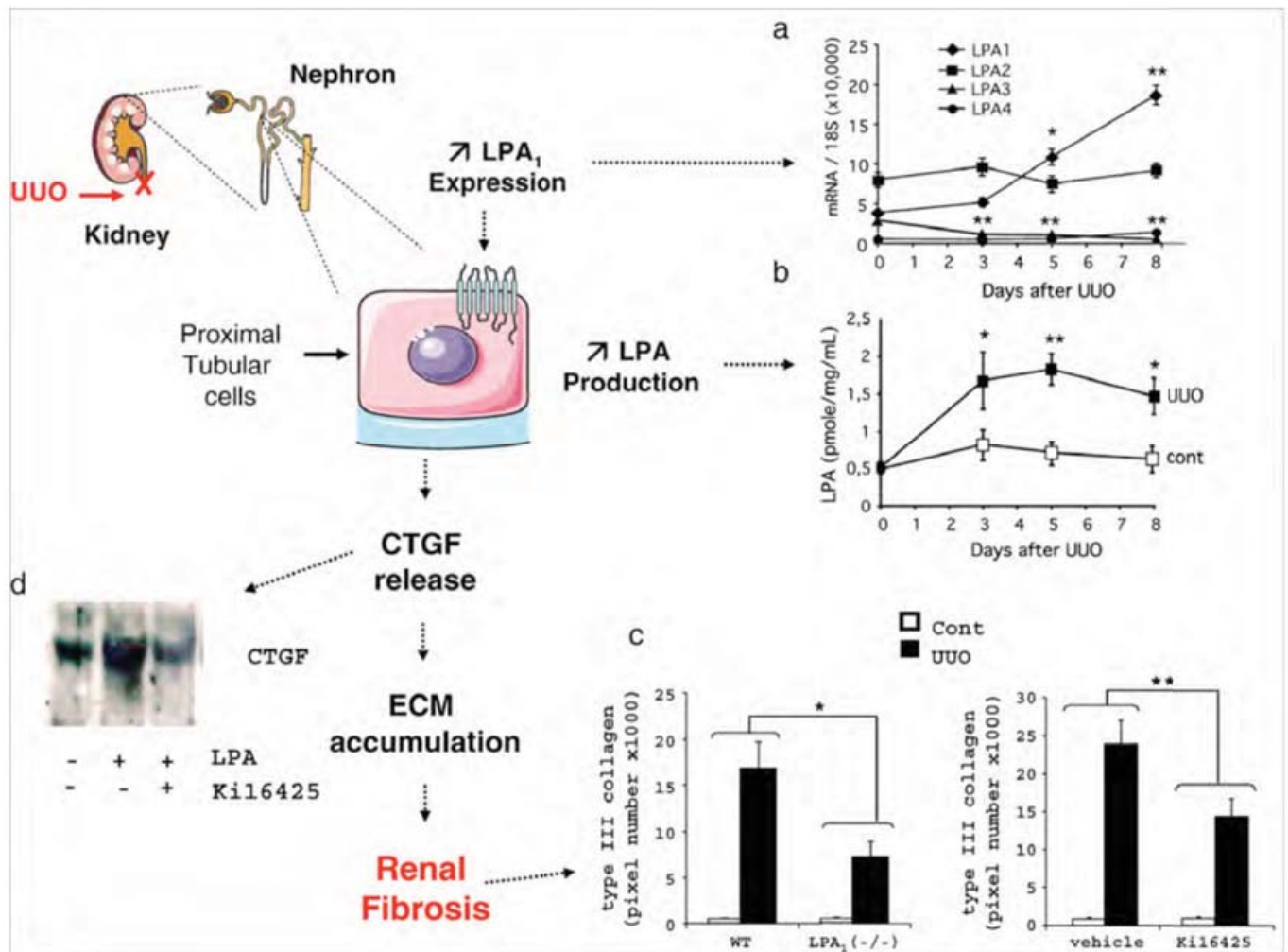


Fig. 2. Overview of the profibrotic effect of LPA and the LPA₁ receptor in unilateral obstruction (UUO)-induced renal fibrosis: The kidney is composed of filtration units called nephrons. We propose that the anti-fibrotic effect of LPA₁-receptor blockade involves reduction of CTGF secretion by proximal tubular cells which are located in the tubular section of the nephron. (a) LPA₁-receptor expression is increased by UUO reaching a maximum after 8 days of obstruction, the day of sacrifice. The expression of the 3 other LPA receptors was not modified, except a slight decrease in the expression of the LPA₃ receptor. (b) In parallel, UUO also increases renal LPA production, starting as early as 3 days after obstruction. (c) UUO-induced renal fibrosis was significantly attenuated by LPA₁-receptor ablation and LPA₁-receptor antagonist (Ki16425) treatment as shown by immunohistochemical analysis and quantification of collagen type III expression. (d) *In vitro*, on tubular cells, LPA treatment induces the expression and release of the profibrotic cytokine, Connective Tissue growth Factor (CTGF). CTGF secretion induced by LPA seems to be LPA₁-receptor dependant, as CTGF secretion is blocked by the LPA₁-receptor antagonist (Ki16425). See details in [31]. Abbreviations: Cont, control non-UUO mice; UUO, unilateral ureteral obstruction; WT, wild type mice; LPA₁ (-/-), LPA₁ receptor knockout mice; WT+Ki16425, wild type mice treated with the LPA₁-receptor antagonist Ki16425.

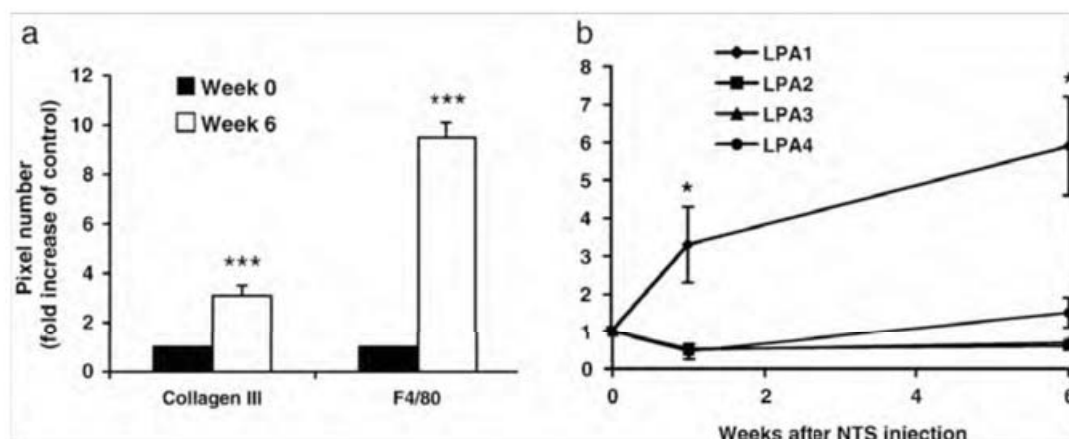


Fig. 3. LPA-receptor expression in a chronic model of renal fibrosis induced by nephrotoxic serum injection (NTS): (a) Inflammation and fibrosis increases 6 weeks after NTS injection. Mice were sacrificed at 0 and 6 weeks after NTS injection and kidneys were analyzed for F4/80 (macrophage) and collagen III (fibrosis) expression using immunohistochemistry. The histograms represent computer-assisted analysis of 10 different microscopic fields of a kidney slice (as described in [31]), obtained from 5 different mice. (b) mRNA expression analysis of LPA receptors. NTS induces expression of the LPA₁ receptor only. Mice are injected with NTS (time 0). Mice are euthanized at the time of NTS injection and 1 or 6 weeks later (n=5). LPA-receptor expression was quantified by real time PCR. Comparisons with time 0 were analyzed by the Student-t-test, *p<0.05.

receptor is likely not involved in the effects of LPA on UUO-induced TIF. The other cell types that can be potential targets of LPA in the development of UUO-induced renal fibrosis include tubular- and inflammatory-cells and interstitial fibroblasts. Since it was already known that LPA can participate in intraperitoneal accumulation of monocyte/macrophages [58,59] and that LPA can induce expression of the profibrotic cytokine CTGF in primary culture human fibroblasts [29], we focused the remainder of our studies on the *in vitro* effects of LPA treatment on tubular cells. In addition, it has been shown that primary culture human proximal tubular cells express the LPA₁ receptor [54]. LPA treatment of a mouse epithelial renal cell line MCT [60] induced a rapid increase of the expression of profibrotic cytokine CTGF (Fig. 2d). CTGF plays a crucial role in UUO-induced TIF [61,62], and is involved in the profibrotic activity of TGF β [6]. This induction was almost completely suppressed by co-treatment with the LPA-receptor antagonist Ki16425 (Fig. 2d). Similar observations were previously made in renal fibroblasts and mesangial cells [25,28,29], where the action of LPA on CTGF was shown to be mediated by the small GTPase rhoA and the down-stream kinase ROCK [28]. Interestingly, treatments with ROCK-inhibitors have been described to attenuate UUO-induced renal TIF [63], similar to what we observed in LPA₁(-/-) and in Ki16425-treated mice. Altogether, these observations strongly suggested that the profibrotic activity of LPA in kidney could result from a direct action of LPA on kidney cells involving induction of CTGF (Fig. 2, [31]).

The metabolic origin of renal LPA remains to be determined. Several enzymes, including phospholipases A1/A2, lysophospholipase D/autotaxin (ATX), glycerol-phosphate acyltransferase, or monoacylglycerol kinase (MAGK), can possibly lead to renal LPA synthesis [64]. The expression and/or the activity of one of these enzymes might be increased in the kidney as an adaptive response to chronic kidney injury induced by UUO. Preliminary data from our laboratory suggest that neither ATX nor MAGK are responsible for the increased synthesis of LPA associated with renal fibrosis, since their expression is rapidly and strongly down-regulated during UUO (data not shown). In rat, UUO was shown to increase the activity of a phosphoethanolamine-specific PLA2 [65]. The involvement of this enzyme in LPA synthesis in the obstructed kidney remains to be explored.

6. LPA-receptor expression in other models of renal fibrosis

Although the UUO model of renal fibrosis mimics the different stages of the development of renal fibrosis, the rapidity by which these lesions are installed does not exactly correspond to the slow progression of human renal disease. The murine model of nephrotoxic serum (NTS) nephritis described by Lloyd CM et al. [66], is characterized by a rapid progressive glomerulonephritis followed by the slow appearance of TIF leading after several weeks to progressive renal failure [67]. This model more closely mimics the slow progression of human renal disease. We show here for the first time modification of LPA-receptor expression in this chronic model (Fig. 3). As previously reported [67], NTS-induced TIF is characterized by an increased expression of fibrosis markers (macrophage infiltration and collagen expression, Fig. 3a). Interestingly, renal expression of the LPA₁ receptor was significantly increased 1 and 6 weeks after NTS injection when compared to control mice (respectively 3.3 ± 1 and 5.9 ± 1.3 fold of control) (Fig. 3b). In contrast, the expression of the other LPA receptors was not modified. This suggest, as shown in the UUO model of accelerated renal fibrosis, that LPA and its receptors can play a role in the development of renal fibrosis originating from glomerulonephritis. An interesting aspect of this model is the fact that this disease is originating from glomerular inflammation. As we discussed above, LPA is inducing important biological effects on glomerular mesangial cells *in vitro* [45–49]. Therefore a blockade of the effects of LPA in this model might modify the progression of disease in both the glomerular- and tubular-compartment. Further studies comparable to those performed

with the UUO model [31] of renal fibrosis will be necessary to better understand the role of LPA and its receptors in CKD.

7. Conclusion

Using both genetically engineered animals and pharmacological tools a number of laboratories have recently shown that LPA and its LPA₁ receptor can play an important role in the development of fibrosis. Mechanisms of the profibrotic action of LPA and the LPA₁ receptor in these different tissues involve stimulation of fibroblast migration, increased vascular permeability and CTGF secretion by a number of cells; all events known to be involved in the fibrotic process [7]. These results suggest that the LPA₁ receptor could become a promising new therapeutic target in fibrosis.

In the kidney, TGF β seems to be only moderately involved in the anti-fibrotic effect of LPA₁-receptor blockade. This cytokine is one of the most potent profibrotic factors involved in the (renal) fibrotic process. Since TGF β has many other effects [68], its blockage is not a realistic therapeutic option to reduce renal fibrosis. More recently, it has been proposed that CTGF blockade could represent a promising anti-fibrotic therapy [61]. Therefore, lowering CTGF production by pharmacological LPA₁-receptor blockade might be an interesting opportunity in the treatment of renal fibrosis.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the INSERM. Julie Klein and Julien Gonzalez were supported by a grant from the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (France). We would like to acknowledge the help of Dr. Alexandre Bénani for the design of Fig. 1. D. Salant is funded by NIH grant DK 30932.

References

- [1] A. Meguid El Nahas, A.K. Bello, Chronic kidney disease: the global challenge, *Lancet* 365 (2005) 331–340.
- [2] P. Boor, K. Sebekova, T. Ostendorf, J. Floege, Treatment targets in renal fibrosis, *Nephrol. Dial. Transplant* 22 (2007) 3391–3407.
- [3] F. Strutz, Potential methods to prevent interstitial fibrosis in renal disease, *Expert Opin. Investig. Drugs* 10 (2001) 1989–2001.
- [4] J.L. Bascands, J.P. Schanstra, Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals, *Kidney Int.* 68 (2005) 925–937.
- [5] M. Iwano, E.G. Neilson, Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 13 (2004) 279–284.
- [6] D.P. Basile, The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: recent progress and future directions, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 8 (1999) 21–30.
- [7] T.A. Wynn, Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 524–529.
- [8] K.R. Watterson, D.A. Lanning, R.F. Diegelmann, S. Spiegel, Regulation of fibroblast functions by lysophospholipid mediators: potential roles in wound healing, *Wound Repair Regen.* 15 (2007) 607–616.
- [9] M. Ruiz-Ortega, C. Bustos, J.J. Plaza, J. Egido, Overexpression of extracellular matrix proteins in renal tubulointerstitial cells by platelet-activating-factor stimulation, *Nephrol. Dial. Transplant* 13 (1998) 886–892.
- [10] M. Ruiz-Ortega, R. Largo, C. Bustos, D. Gomez-Garre, J. Egido, Platelet-activating factor stimulates gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta, *J. Am. Soc. Nephrol.* 8 (1997) 1266–1275.
- [11] K. Doi, K. Okamoto, K. Negishi, Y. Suzuki, A. Nakao, T. Fujita, A. Toda, T. Yokomizo, Y. Kita, Y. Kihara, S. Ishii, T. Shimizu, E. Noiri, Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 1413–1424.
- [12] S.N. Giri, A.K. Sharma, D.M. Hyde, J.S. Wild, Amelioration of bleomycin-induced lung fibrosis by treatment with the platelet activating factor receptor antagonist WEB 2086 in hamsters, *Exp. Lung Res.* 21 (1995) 287–307.
- [13] K. Kuroda, Y. Morimoto, A. Ogami, T. Oyabu, H. Nagatomo, M. Hirohashi, H. Yamato, Y. Nagafuchi, I. Tanaka, Phospholipid concentration in lung lavage fluid as biomarker for pulmonary fibrosis, *Inhal. Toxicol.* 18 (2006) 389–393.
- [14] K. Yasuda, A. Sato, K. Nishimura, K. Chida, H. Hayakawa, Phospholipid analysis of alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid following bleomycin administration to rabbits, *Lung* 172 (1994) 91–102.
- [15] J.E. Adrian, K. Poelstra, G.L. Scherphof, D.K. Meijer, A.M. van Loenen-Weemaes, C. Reker-Smit, H.W. Morselt, P. Zwiens, J.A. Kamps, Effects of a new bioactive lipid-based drug carrier on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in bile duct-ligated rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321 (2007) 536–543.

Critical Role of Tissue Kallikrein in Vessel Formation and Maturation

Implications for Therapeutic Revascularization

Oliver A. Stone, Christine Richer, Costanza Emanuelli, Vincent van Weel, Paul H.A. Quax, Rajesh Katare, Nicolle Kraenkel, Paola Campagnolo, Luciola S. Barcelos, Mauro Siragusa, Graciela B. Sala-Newby, Danila Baldessari, Marina Mione, Marie P. Vincent, Andrew V. Benest, Ayman Al Haj Zen, Julien Gonzalez, David O. Bates, Francois Alhenc-Gelas, Paolo Madeddu

Objective—Human Tissue Kallikrein (*hKLK1*) overexpression promotes an enduring neovascularization of ischemic tissue, yet the cellular mechanisms of *hKLK1*-induced arteriogenesis remain unknown. Furthermore, no previous study has compared the angiogenic potency of *hKLK1*, with its loss of function polymorphic variant, rs5515 (R53H), which possesses reduced kinin-forming activity.

Methods and Results—Here, we demonstrate that *tissue kallikrein* knockout mice (*KLK1*^{-/-}) show impaired muscle neovascularization in response to hindlimb ischemia. Gene-transfer of wild-type *Ad.hKLK1* but not *Ad.R53H-hKLK1* was able to rescue this defect. Similarly, in the rat mesenteric assay, *Ad.hKLK1* induced a mature neovasculature with increased vessel diameter through kinin-B₂ receptor-mediated recruitment of pericytes and vascular smooth muscle cells, whereas *Ad.R53H-hKLK1* was ineffective. Moreover, *hKLK1* but not *R53H-hKLK1* overexpression in the zebrafish induced endothelial precursor cell migration and vascular remodeling. Furthermore, *Ad.hKLK1* activates metalloproteinase (MMP) activity in normoperfused muscle and fails to promote reparative neovascularization in ischemic *MMP9*^{-/-} mice, whereas its proarteriogenic action was preserved in *ApoE*^{-/-} mice, an atherosclerotic model of impaired angiogenesis.

Conclusions—These results demonstrate the fundamental role of endogenous Tissue Kallikrein in vascular repair and provide novel information on the cellular and molecular mechanisms responsible for the robust arterialization induced by *hKLK1* overexpression. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:00-00.)

Key Words: angiogenesis ■ gene therapy ■ gene mutations ■ metalloproteinases ■ tissue kallikrein

Peripheral artery disease (PAD) is a major global economic healthcare burden, with dissatisfactory treatment strategies available to date. Pleiotropic agents, such as proteases able to interfere at various levels of the angiogenic program, could represent a valuable option for the treatment of ischemic disease. The catalytic class of serine proteases, which encompasses trypsin-like enzymes, has recently been implicated in angiogenesis.^{1,2}

Our group has proposed another member of this class, human tissue kallikrein 1 (*hKLK1*), as a potent factor for promotion of therapeutic neovascularization, as indicated by studies in animal models of ischemia.^{3,4} *hKLK1* can exert its effects via kininogen cleavage, thus generating kinins (eg, bradykinin - BK or kallidin - kDa).⁵ Kinins, such as BK, activate kinin-B₂ receptors (B₂R), which are constitutively expressed on endothelial cells (ECs), and kinin-B₁ receptors (B₁R), whose expression is induced

under stress conditions.⁵ Overexpression of *hKLK1* promotes a robust and persistent neovascularization through kinin-mediated activation of the Akt-eNOS pathway, and has recently been shown to display tissue specific VEGF dependency.^{4,6} It is not known, however, whether *hKLK1* could promote the activation of other proangiogenic enzymes like metalloproteinases (MMP). Furthermore, although studies on B₂R or B₁R knockout mice have established the role of kinin receptors in reparative angiogenesis,⁷⁻⁹ no information is available on the importance of endogenous kallikrein in postischemic vascular healing. This issue is relevant especially in the light of recent demonstration that function-defective variants of the *hKLK1* gene are frequent in the general population. In man, a common missense polymorphism in exon 3 of the *hKLK1* gene (rs5515), replacing an active site arginine at position 53 with a histidine (*R53H-hKLK1*), results in a major loss of kinin-forming activity.¹⁰ The

Received December 5, 2008; revision accepted January 9, 2009.

From the Microvascular Research Laboratories, Bristol Heart Institute, Department of Physiology and Pharmacology (O.A.S., A.V.B., D.O.B.), University of Bristol, UK; INSERM U652/U872, Centre de Recherche des Cordeliers (C.R., M.P.V., F.A.-G.), Paris, France; Experimental Cardiovascular Medicine (CE., R.K., N.K., P.C., L.S.B., M.S., A.A.H.Z., P.M.) and Vascular Biology Division (G.B.S.-N), Bristol Heart Institute, University of Bristol, UK; The Gubius Laboratory TNO Quality of Life (V.v.W., P.H.A.Q.), Leiden, the Netherlands; Department of Surgery (V.v.W., P.H.A.Q.), Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands; IFOM, Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (D.B., M.M.), Milan, Italy; and I2MR INSERM U858 (J.G.), Toulouse, France.

Correspondence to Prof Paolo Madeddu, Experimental Cardiovascular Medicine, Bristol Heart Institute, Level 7, Bristol Royal Infirmary, Upper Maudlin Street, University of Bristol, Bristol, BS2 8HW, United Kingdom. E-mail madeddu@yahoo.com

© 2009 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.182139

Downloaded from atvb.ahajournals.org at Queen Mary, University of London on February 4, 2009

mutation is associated with inward remodeling of the brachial artery, which is not adapted to a chronic increase in wall shear stress, indicating a new form of arterial dysfunction.¹¹

Here, we provide evidence that deletion of the murine *KLK1* gene is deleterious for reparative neovascularization. Moreover, the *R53H-hKLK1* variant leads to an immature neovascularization. Furthermore, we demonstrate that levels of *hKLK1* are relevant for the promotion of developmental vasculogenesis, arteriogenesis in the rat mesenteric assay, and postischemic neovascularization in the mouse ischemic hindlimb muscle.

Methods

For supplemental methods please see <http://atvb.ahajournals.org>.

Animal Models

Unilateral Ischemia was induced in male age-matched *tissue kallikrein* knockout (*KLK1*^{-/-}), *MMP9*^{-/-}, *ApoE*^{-/-}, and appropriate wild-type (WT) control mice. Limb blood flow recovery was assessed by Laser Doppler flowmetry. Capillary and arteriole densities were evaluated postmortem by immunohistochemistry.

The rat mesenteric angiogenesis assay was used to investigate the cellular mechanisms of *hKLK1*-induced angiogenesis. Male rats were anesthetized and a laparotomy performed under sterile conditions. The mesenteric panels were imaged intravitaly. Adenoviruses of interest were injected into the mesenteric fat pad. The animal was sutured and allowed to recover. Six days later the same mesenteric panel was located and imaged. After *in vivo* fixation, staining for blood vessel cell markers (isolectin B4 for endothelium; NG2 for pericytes; α SMA for vascular smooth muscle cells [VSMCs]) was imaged by confocal microscopy.

The zebrafish was used to test the effect of *hKLK1* on prenatal vasculogenesis. *Tg(fli1:egfp)*^{y1} zebrafish embryos were injected with 10 to 50 pg of *hKLK1* mRNA at the one-two cell stage. *Tg(fli1:egfp)*^{y1} zebrafish embryos were first examined under a fluorescence microscope at 20 hours after fertilization (hpf) and then regularly every 2 hours until they reached 42 hpf. Half of the injected embryos were fixed in 4% paraformaldehyde at 24 hpf, and the remainder were allowed to progress until 48hpf. Fixed embryos were stained with anti-GFP serum and imaged. To study the fate of supernumerary GFP⁺ cells, ectopic GFP⁺ cells were visualized in living embryos and subjected to time-lapse analysis with a Leica SP2 confocal microscope as previously described.

In Situ Zymography

Gelatinolytic in situ zymography was performed as previously described.¹²

Pericyte Wound Healing Assay

Bovine retinal pericytes (BRP) were grown to confluence on fibronectin/gelatin-coated 48-well plates in complete medium (DMEM supplemented with 1g/L glucose, L-Glutamine and 20% FBS). BRPs were subjected to the scratch wound assay as previously described and then incubated in the conditioned medium of bovine retinal endothelial cells (BREC) infected with *Ad.hKLK1*, *Ad.Null*, or control medium (250 MOI). Conditioned medium was diluted 1:100 in DMEM with 2% FBS and 2 mmol/L hydroxyurea (to block cell proliferation) with or without the addition of B₂R antagonist Icatibant (5×10^{-7} mol/L). After 24 hours gap closure was calculated.

FACS Analysis of Mononuclear Cells

Mononuclear cells (MNCs) from peripheral blood (PB) and BM of *KLK1*^{-/-} and WT mice were analyzed for the expression of cKit, Sca-1, and lineage antigens by flow cytometry (FACS Calibur).

Statistical Analysis

Results are expressed as distribution of sample value or mean \pm SEM. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Comparisons between means of data were performed using the Student *t* test, or

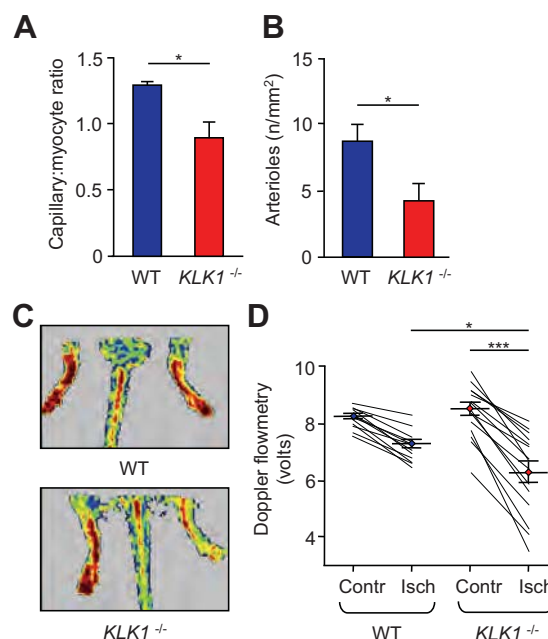


Figure 1. Reparative neovascularization is impaired in *KLK1*^{-/-} mice. A and B, Capillary:myocyte ratio and arteriole density in adductors harvested 14 days postischemia. C, Representative laser Doppler images collected at 14 days postischemia. D, Comparison of blood flow in ischemic and contralateral limbs. (All data: mean \pm SEM. Histology: n=6. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

ANOVA when comparing more than 2 groups. Posthoc Mann-Whitney tests were used when ANOVA showed overall $P < 0.05$.

Results

Impaired Reparative Neovascularization in Kallikrein Knockout Mice: Rescue by Wild-Type *hKLK1* but not Mutant *R53H-hKLK1* Gene Transfer

To evaluate the importance of endogenous *KLK1* in reparative angiogenesis, we applied the classical model of unilateral limb ischemia to *KLK1*^{-/-} mice and WT littermates.⁴ In previous studies, *KLK1*^{-/-} mice showed impaired flow-dependent vasodilatation of large arteries,¹³ without obvious alterations in vascular structure.¹⁴ Consistently, vascular density was similar in normoperfused muscles from *KLK1*^{-/-} and WT mice (data not shown). However, the neovascularization response to limb ischemia was profoundly altered at capillary (Figure 1A) and arteriole (Figure 1B) level, which led to delayed perfusion recovery of the ischemic limb of *KLK1*^{-/-} mice (Figure 1C and 1D). Peripheral ischemia promotes the activation and mobilization of bone marrow Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ hematopoietic progenitor cells with proangiogenic capacity¹⁵ and Flk1⁺cKit⁺ vascular progenitor cells.¹⁶ We found that Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ and Flk1⁺cKit⁺ progenitor cell activation by ischemia is blunted in *KLK1*^{-/-} mice (supplemental Figure I). Altogether, these results indicate that *KLK1* is important for the activation of postischemic reparative responses at both local and bone marrow levels.

We then evaluated whether *Ad.hKLK1* and the mutant *Ad.R53H-hKLK1* are equipotent in promoting reparative angiogenesis in WT and *KLK1*^{-/-} mice. Gene expression was confirmed by RT-PCR (supplemental Figure II). As shown in Figure 2, *Ad.hKLK1* gene therapy was able to improve the

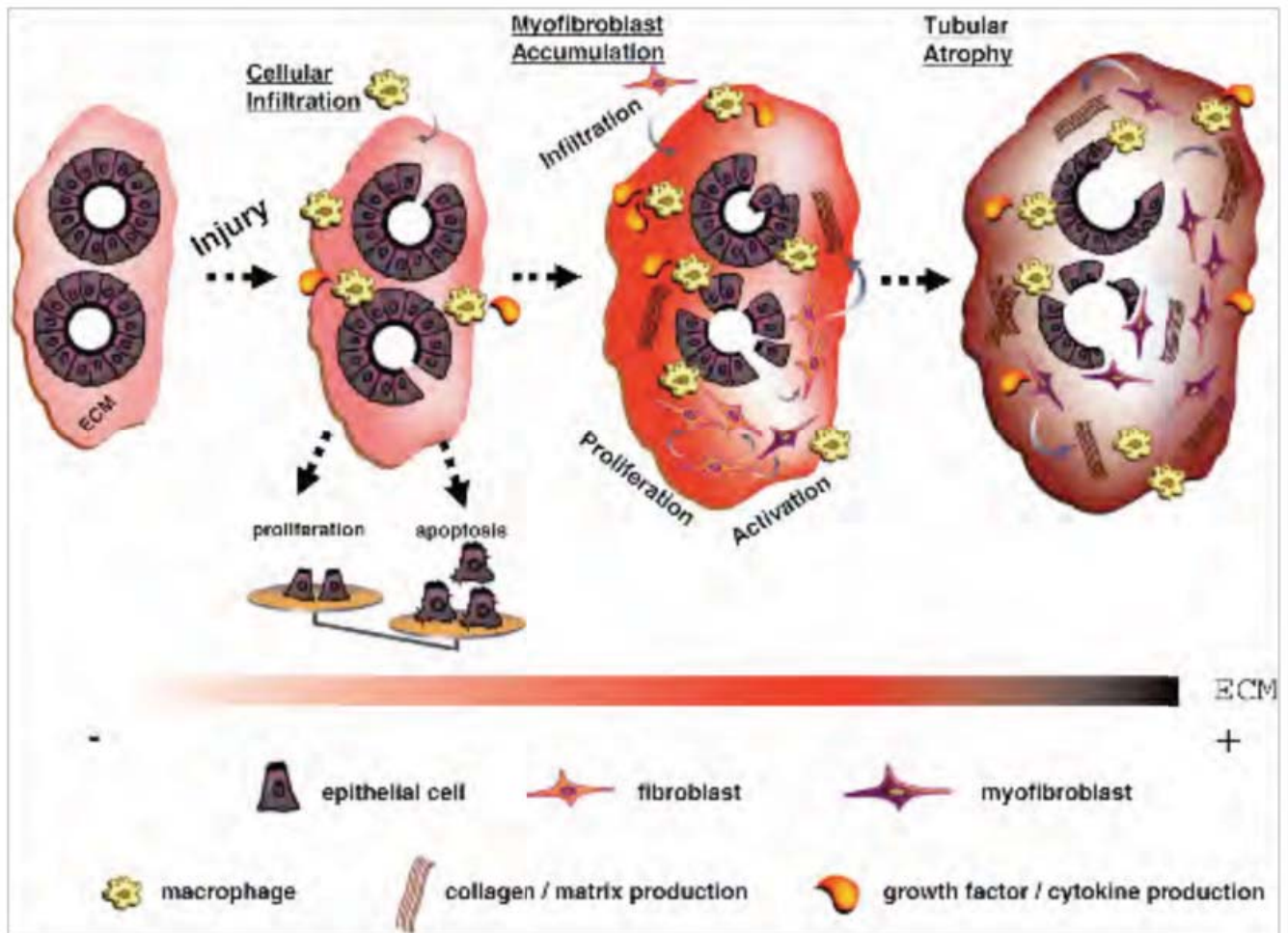


Fig. 1. Overview of the different stages in the development of renal fibrosis: the development of fibrosis in CKD is comparable between the different renal compartments [1]. For clarity the development of only renal TIF is shown. The first step in the development of TIF is renal inflammation. This is leading to infiltration of macrophages, lymphocytes, and to increased cytokine and chemokine secretion. This inflammatory state induces a disequilibrium between apoptosis and proliferation of tubular cells, as well as accumulation of myofibroblasts. These myofibroblasts are the main cell type responsible for the secretion of the ECM. As CKD progresses, ECM deposition becomes massive and uncontrolled apoptosis of tubular cells leads to tubular atrophy. This figure was adapted from [4], with permission.

of these three phospholipids in the development of fibrosis in various organs will be presented below, with a particular emphasis on LPA.

In vitro studies show PAF as an important actor in the development of renal tubulointerstitial fibrosis. PAF induces the production of the ECM-components collagen type I and IV and fibronectin by rat fibroblasts and tubular cells [9]. PAF also induces the production of the profibrotic cytokine TGF β [10]. *In vivo*, genetic ablation or pharmacological blockade of the PAF receptor induces a significant decrease of folic acid-induced renal fibrosis in rodent models [11]. Furthermore, PAF is also involved in pulmonary fibrosis as administration of a PAF receptor antagonist attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [12].

Other phospholipids are associated with the progression of pulmonary fibrosis. Different studies describe an increase of phospholipid concentrations in the bronchoalveolar lavage fluid and in particular phosphatidylcholine (PC) in rabbits and rodents injected with bleomycin [13,14]. The production of PC under these conditions might be beneficial as it was shown that diunooleoylphosphatidylcholine *in vitro* and *in vivo*, induces a significant reduction in the expression of genes coding for ECM molecules and inflammatory mediators during bile duct ligation-induced liver fibrosis [15].

3. LPA and fibrosis

LPA is a growth factor-like phospholipid known to regulate several cellular processes including cell motility, cell proliferation, cell

survival, and cellular differentiation. LPA acts on specific G-protein coupled receptors (LPA $_1$ to LPA $_6$) [16]. Pharmacological tools to study the involvement of these different LPA receptors have been limited. Currently, the most frequently used pharmacological agent is Ki16425 that has been shown to block LPA $_1$ - and LPA $_2$ -receptor subtypes both *in vitro* [17] and *in vivo* [18]. Mice invalidated for the LPA-receptor subtype 1, 2 and 3 are also available [19–21]. Among the different bioactive phospholipids, lysophosphatidic acid (LPA) has been associated with the etiology of a growing number of disorders [22]. Furthermore, a number of studies suggest a role for LPA in the development of fibrosis (see the discussion below).

A number of muscular dystrophies are characterized by a progressive weakness and wasting of musculature, and by extensive fibrosis. It has been shown that LPA treatment of cultured myoblasts induced significant expression of connective tissue growth factor (CTGF). CTGF subsequently induces collagen, fibronectin and integrin expression and induces dedifferentiation of these myoblasts [23]. This example is introducing the unambiguous link between LPA and CTGF; it has been shown that treatment of a variety of cell types with LPA induces reproducible and high level induction of CTGF [24–32], although not necessarily in cells directly involved in the fibrotic process. CTGF is an important profibrotic cytokine, signaling down-stream and in parallel with TGF β [33]. In this context CTGF expression by gingival epithelial cells, which are involved in the development of gingival fibromatosis, was found to be exacerbated by LPA treatment [34].

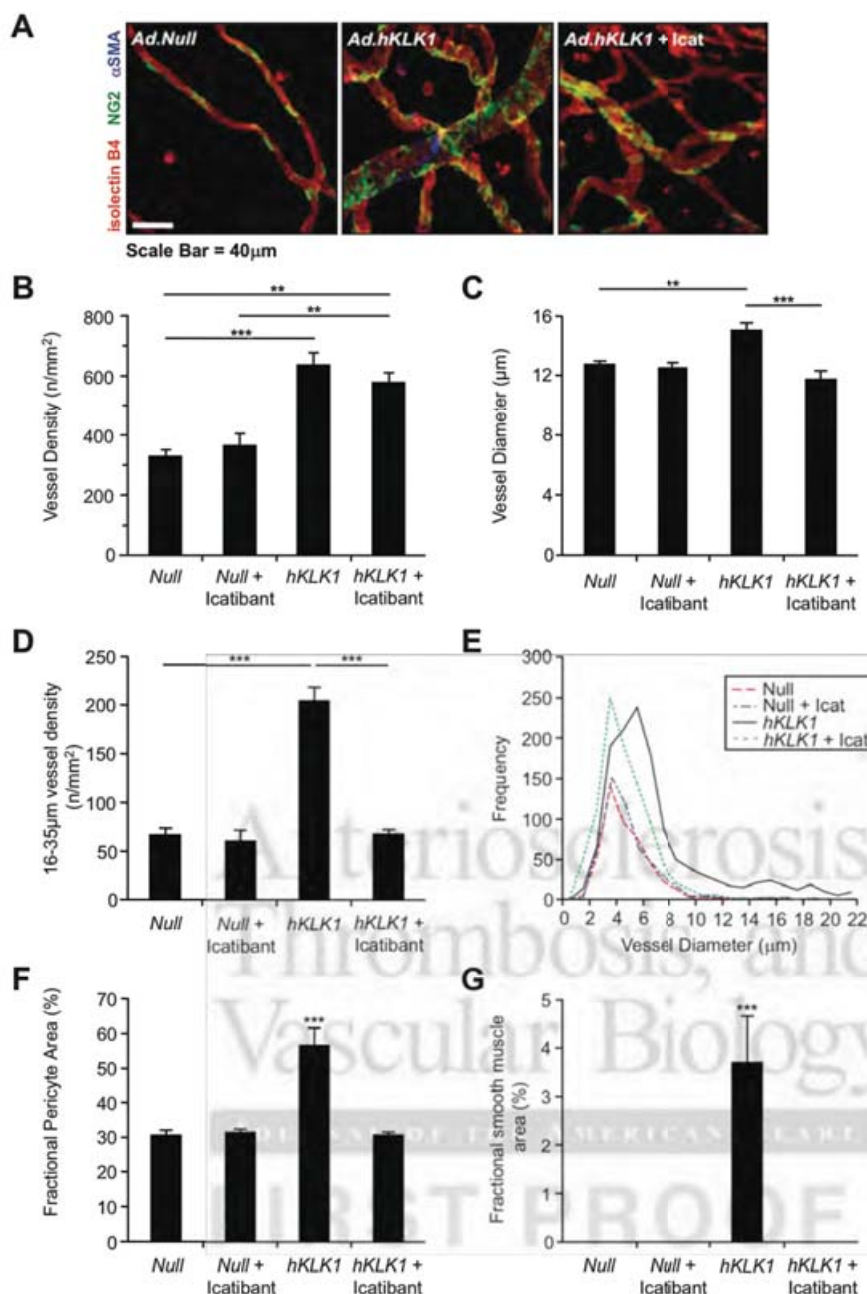


Figure 3. *hKLK1*-induced arteriogenesis. Confocal-stack images (A) from rat mesentery 6 days after treatment. *hKLK1* induces arteriogenesis via kinin-B2 receptor activation as demonstrated by comparison of vessel density (B), diameter (C), conduit vessel density (D), distribution (E), and perivascular cell coverage (F and G). (All data: mean \pm SEM, $n=6$. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$).

hKLK1 Induces In Vitro Pericyte Migration

To further confirm that pericytes are activated by *hKLK1*, we performed an in vitro scratch assay in which bovine pericytes were stimulated with the conditioned medium of ECs infected with *Ad.Null* or *Ad.KLK1*. Results indicate that the conditioned medium from *hKLK1*-infected ECs stimulated pericyte migration (gap closure, 75 ± 7 versus $58 \pm 3\%$ in *Ad.Null*, $P<0.05$), with this effect inhibited by icatibant (gap closure, $58 \pm 2\%$, $P=N.S.$ versus *Ad.Null*).

Vascular Remodeling by *hKLK1* Gene Delivery in Zebrafish

We then evaluated the effects of *hKLK1* overexpression in a complex in vivo developmental system, the zebrafish. Components of the kallikrein-kinin system are expressed in

zebrafish including homologues of B_1R , B_2R and Kininogen.¹⁷ We injected *hKLK1* and *R53H-hKLK1* mRNA into 1 to 2 cell stage zebrafish embryos of the transgenic line *tg(fli1:egfp)^{y1}*, which express GFP in hemangioblasts, ECs, and migrating leukocytes.¹⁸ Antibodies against *hKLK1* demonstrated ubiquitous expression in *hKLK1* mRNA injected embryos and expression of a zebrafish homologue in noninjected embryos (supplemental Figure VII). Injecting *R53H-hKLK1* mRNA or up to 1 ng of mRNA encoding for *hKLK1* did not affect vasculogenesis. Injecting 1.5 ng or 2 ng of *hKLK1* mRNA led to a reproducible phenotype, which becomes visible just before the sprouting of intersegmental vessels (ISV) from the dorsal aorta (DA), ie, around 24-somite stage, in approximately 35% of injected embryos. Some ECs (1 to 4 per embryo) were found in ectopic positions along the trunk, detached from the ISV

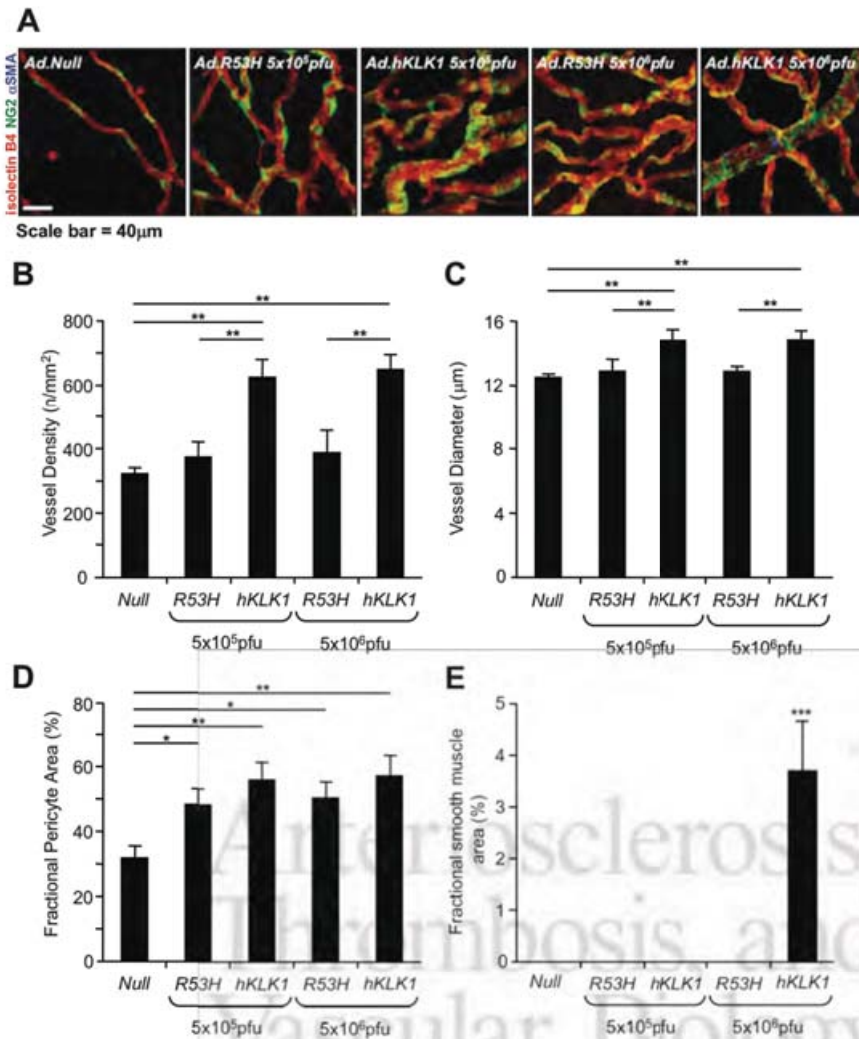


Figure 4. R53H impairs the arteriogenic ability of *hKLK1*. Confocal-stack images (A) from rat mesentery 6 days after treatment. Two viral doses were used. Comparison of vessel density (B), diameter (C), and perivascular cell coverage (D and E) indicates a reduced capacity to induce vessel maturation. (All data: mean \pm SEM, $n=6$. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ vs *Ad.Null*).

sprouts and from the DA (supplemental Figure VII, supplemental movies I and II). These cells (which were twice as large as leukocytes/tissue macrophages found on the ventral side of the embryos) do not migrate from the position where they appear, but behave like endothelial tip cells (when observed by confocal microscopy), ie, extend several filopodia and protrusions that sense the environment. Later, they are reached by the ISV sprouts and become incorporated in the growing vessels. The ectopic *flil:egfp* expressing cells did not express VE-cadherin before being incorporated in the nascent vasculature, thus suggesting that they might be undifferentiated hemangioblasts or macrophages that later transdifferentiate to ECs.

Involvement of MMP9 in *hKLK1*-Induced Neovascularization

We delivered *Ad.hKLK1* and *Ad.Null* to normoperfused adductor muscles. Three days after injection, *Ad.hKLK1* increased the cleavage of DQ MMP substrate compared with *Ad.Null* and this increase was blocked by the Zn^{2+} chelator, EDTA and the specific inhibitor of MMP activity, Galardin (Figure 5A). *Ad.hKLK1* delivery to ischemic muscles accelerated the recovery of WT control mice but not of *MMP9*^{-/-} mice (Figure 5B). Furthermore, *Ad.hKLK1* promoted neovas-

cularization at both the capillary and arteriole level in WT but not in *MMP9*^{-/-} mice (Figure 5C and 5D).

To exclude that failure of *Ad.hKLK1* to promote angiogenesis in *MMP9*^{-/-} mice is unspecific (eg, ascribable to a generic unresponsiveness to exogenous stimulation), we evaluated the healing action of *hKLK1* gene transfer in *ApoE*^{-/-} mice, which share with *MMP9*^{-/-} mice the same genetic background and reduced capacity to build arterial collaterals in response to ischemia. To test this, intramuscular injection of *Ad.hKLK1* or control *Ad.LacZ* was performed at the time of operative femoral artery occlusion. Because we had previous evidence that collateral artery development is inversely correlated to plasma cholesterol levels,¹⁹ the study was conducted in *ApoE*^{-/-} mice fed on a cholesterol-enriched high-fat diet (cholesterol levels were 39 ± 8 mmol/L and 37 ± 5 mmol/L, for *Ad.LacZ* and *Ad.hKLK1* group, respectively; $P=N.S.$). RT-PCR confirmed no difference in *hKLK1* or murine *B_{2R}* mRNA between *MMP9*^{-/-}, *ApoE*^{-/-}, and WT mice (supplemental Table I). Laser-Doppler perfusion in the ischemic limb was 2.2-fold and 1.6-fold increased in *Ad.hKLK1*-treated mice as compared with *Ad.LacZ*-treated mice, at 3 and 7 days after femoral artery occlusion ($P<0.01$ and 0.02, respectively; Figure 6A).

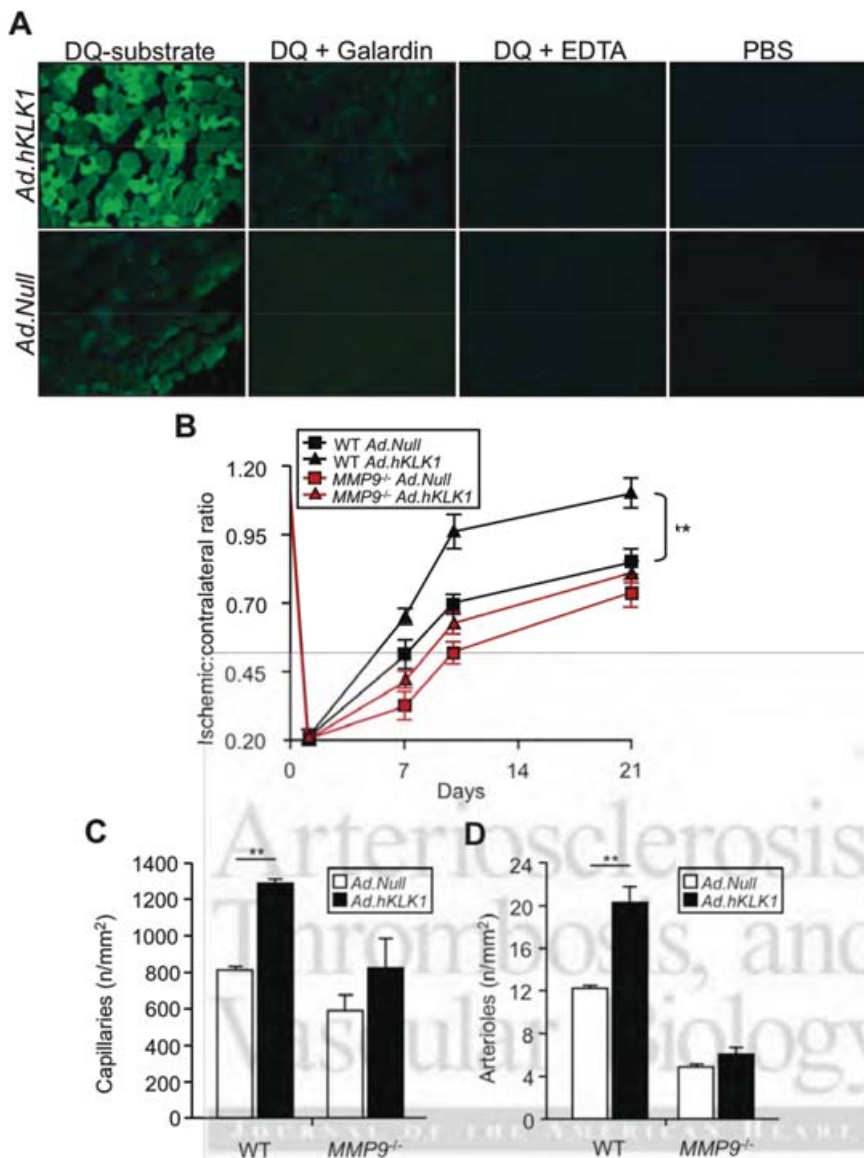


Figure 5. Involvement of MMP-9 in *hKLK1*-induced neovascularization. **A**, Gelatinolytic in situ zymography on non-perfused adductors. **B**, Comparison of hemodynamic recovery after ischemia. *Ad.hKLK1* increased capillary (**C**) and arteriole density (**D**) in adductors from WT but not *MMP9*^{-/-} mice, 21 days post-ischemia. (All data: mean \pm SEM *n*=8. ***P*<0.01).

We then conducted postmortem angiography studies to determine whether the improved perfusion recovery after *Ad.hKLK1* treatment correlates with an increased score of visible collateral arteries. Angiography was technically successful in 7 *Ad.hKLK1*-treated and 8 *Ad.LacZ*-treated mice. Of the *Ad.hKLK1*-treated mice, 7/7 mice (100%) demonstrated well-developed collateral arteries with moderate to good distal filling of the femoral artery, whereas only 4/8 of the *Ad.LacZ*-treated mice (50%) showed collateral arteries with distal filling. The 4 remaining mice in the *Ad.LacZ* group showed no filling of the femoral artery distal to the occlusion (Figure 6B). The angiographic Rentrop score of collateral arteries was 1.9-fold increased in *Ad.hKLK1*-treated mice as compared with control mice (*P*<0.05, Pearson Chi-square test; Figure 6C). These data were further supported by immunohistochemical studies indicating that *Ad.hKLK1* treatment improves collateral artery development in this model (Figure 6D, *P*<0.01 versus *Ad.LacZ*), leading to a 1.5-fold increase in vascular area (28.4 ± 3.9 versus $18.7 \pm 3.2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ in *Ad.LacZ*, *P*<0.05). Furthermore, *Ad.hKLK1* treatment in-

creased vessel pericyte coverage (Figure 6E and 6F, *P*<0.001 versus *Ad.LacZ*).

Discussion

Delivering therapeutic genes into the cardiovascular system represents an attractive approach for the cure of ischemic disease. Although a large number of preclinical studies around the world have highlighted the potential of master angiogenic factors such as VEGF and FGF family members, clinical studies have shown disappointing results. Pleiotropic agents like *hKLK1* have shown potential, but their therapeutic activity has mainly been validated in single laboratories. In the present study, different groups were engaged in validating the arteriogenic action of *hKLK1*. Results consistently demonstrated that *hKLK1* overexpression stimulates a well-organized and functional neovascularization, whereas the polymorphic variant, *R53H-hKLK1*, is devoid of such capacity.

This study newly demonstrates the importance of endogenous kallikrein in vascular repair. We document that *KLK1*^{-/-} mice display an altered neovascularization response to limb ischemia

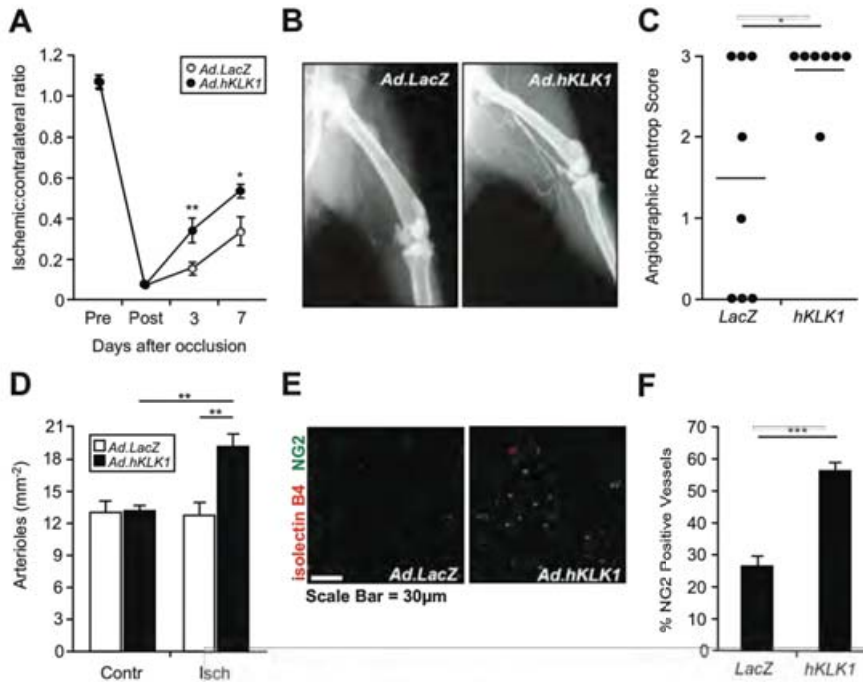


Figure 6. *Ad.hKLK1* promotes postischemic arteriogenesis in *ApoE*^{-/-} mice. **A**, Comparison of hemodynamic recovery after ischemia. **B**, Representative post-mortem angiograms 7 days after hindlimb ischemia. *Ad.hKLK1*-treated mice show an increased angiographic Rentrop score (**C**) and arteriole density (**D**). *Ad.hKLK1* increased pericyte coverage (**E** and **F**). (All data: mean \pm SEM, *n*=8. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001).

resulting in profoundly delayed hemodynamic recovery. *KLK1*^{-/-} mice also show an impaired postischemic activation of bone marrow cKit⁺Flk1⁺ vascular progenitor cells. Stem cells of the BM are reportedly activated after ischemia by the cooperation of multiple mechanisms involving proteases and nitric oxide (NO) bioavailability.²⁰ We recently demonstrated that kinins exert potent chemoattractant effects on human CD133⁺CD34⁺ and murine Lin⁻cKit⁺ progenitor cells through a PI3K/Akt/eNOS-mediated mechanism.²¹ We also know from pilot studies that human EPCs express *hKLK1* and that inhibition of *KLK1* by aprotinin or kallistatin results in reduction of EPC invasive capacity (Spinetti et al, unpublished results). Thus, the endogenous kallikrein-kinin system might play a role in multiple steps of postnatal vasculogenesis. Delivery of *hKLK1* mRNA to the developing zebrafish resulted in transitory acceleration of vasculogenesis, confirming that this process might be manipulated for therapeutic purposes by overexpressing *hKLK1*.

The altered arteriogenesis of *KLK1*^{-/-} mice was rescued by local *Ad.hKLK1* gene therapy, whereas the *R53H-hKLK1* mutant was ineffective. The *R53H* mutant of *hKLK1* has 1% kininogenase activity of the wild-type and is present, at the heterozygote state, in 14% of black and 7% of white subjects.¹⁰ The *R53H* allele carriers have reduced urinary kallikrein activity, decreased levels of plasma *KLK1*, and display a mild form of endothelial dysfunction in resting condition.¹¹ The present study shows that the *R53H-hKLK1* variant has impaired angiogenic/arteriogenic activity compared to wild-type *hKLK1* in normoperfused and ischemic models. The residual angiogenic activity of the *R53H* mutant could be hypothesized to result from the large enzyme excess, cleavage of thus far unidentified substrates or direct kinin-independent activation of B₂R, as recently described.²² It would therefore be of interest to determine whether patients carrying the *R53H* mutation and suffering from coronary or

peripheral artery disease are at a worse prognosis because of impairment in postischemic collateralization similar to that observed in *KLK1*^{-/-} mice.

To clarify the cellular basis of *Ad.hKLK1*-induced arteriogenesis, without the confounding necrosis and inflammation background typical of ischemic tissues, we next sought to test the candidate angiogenic factor in a normoperfused tissue. To this aim, we delivered 2 doses of *Ad.hKLK1*, *Ad.R53H-hKLK1* or control *Ad.Null* to the rat mesentery, a model uniquely suited to obtain a detailed cellular characterization of neovessel phenotype.²³ Results indicate that the wild-type variant stimulates the formation of functional conduit vessels (16 to 35 μ m diameter in rats), developing through vessel branching and perivascular cell recruitment. The absence of sprout points but increased branching and increased vessel density either suggests that the sprouts form and are rapidly remodeled to vessels because of recruitment of supporting cells, or that vessel growth occurs via other means (such as intussusceptive growth).

Pericytes and VSMCs not only provide a logistic support to vascular endothelium, but also dynamically modulate the phenotypic change from a proliferative angiogenic sprout to a mature microvascular conduit within a quiescent endothelium.²⁴ Several signaling pathways govern perivascular cell recruitment and specification, including Ang1/Tie2, PDGF-B/PDGFR- β , and Jagged- δ -like/Notch signaling pathways.²⁴ We demonstrate for the first time that pericytes express B₂R. Under B₂R blockade, *hKLK1*-induced neovasculature is converted to an inflammatory-type sprouting capillarization with reduced pericyte coverage, no VSMC coverage and microhemorrhages, resembling the picture seen after VEGF-A overexpression in the same model.²³ Furthermore, we found that cultured bovine pericytes, via B₂R, are chemotactically activated by the conditioned media of *Ad.hKLK1*-infected ECs. Altogether, these results illustrate the following possible

scenario: overexpression of the *hKLK1* transgene generates kinins, leading to EC proliferation and sprouting, which is then arrested and remodeled by kinin-recruited pericytes and VSMCs. The failure of *R53H-KLK1*, a variant with markedly reduced kinin-generating activity,¹¹ in promoting neovascularization and perivascular cell recruitment further supports our hypothesis.

We then determined whether activation of MMP contributes to vascular repair by *hKLK1*. Zymography studies verified the capacity of *hKLK1* to process pro-MMP into active MMP. Furthermore, intramuscular *Ad.hKLK1* gene therapy was severely impaired in ischemic *MMP9*^{-/-} mice, suggesting that MMP9 is fundamental for *hKLK1*-induced angiogenesis in vivo. The therapeutic value of *Ad.hKLK1* gene therapy was then challenged in *ApoE*^{-/-} mice, which were subjected to limb ischemia. Angiographic demonstration of improved collateralization accounts for the accelerated blood flow recovery observed in hypercholesterolemic *ApoE*^{-/-} mice. These results indirectly discount the possibility that failure of *Ad.hKLK1* gene therapy in *MMP9*^{-/-} mice is attributable to intrinsic defects of collateralization. The pleiotropic mechanisms implicated in *KLK1*-induced neovascularization are summarized in supplemental Figure VIII.

In conclusion, this preclinical study opens new avenues for the therapeutic application of *hKLK1* gene therapy and also supports the possibility that loss of function mutations of the *hKLK1* gene might be detrimental for proper reparative arteriogenesis.

Acknowledgments

We acknowledge the technical contribution of Anne Pizard in creating mutant kallikrein cDNA constructs.

Sources of Funding

This study was supported by the BHF (D.O.B.: grants FF/06/038, BB06/005, and BB2000003; P.M.: FS/06/083/21828 and PG/06/035/20641) and European Community through the FP6 EVGN Network of Excellence (www.evgn.org; to P.H.A.Q., M.M., F.A.-G., and P.M.).

Disclosures

None.

References

- Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1104–1117.
- Milia AF, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Madeddu P, Trevisani M, Geppetti P, Emanuelli C. Protease-activated receptor-2 stimulates angiogenesis and accelerates hemodynamic recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ Res*. 2002;91:346–352.
- Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Stacca T, Milia AF, Spano A, Chao J, Chao L, Sciola L, Madeddu P. Prevention of diabetes-induced microangiopathy by human tissue kallikrein gene transfer. *Circulation*. 2002;106:993–999.
- Emanuelli C, Salis MB, Van Linthout S, Meloni M, Desortes E, Silvestre JS, Clergue M, Figueroa CD, Gadau S, Condorelli G, Madeddu P. Akt/protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer. *Circulation*. 2004;110:1638–1644.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*. 1992;44:1–80.
- Yao YY, Yin H, Shen B, Smith RS Jr, Liu Y, Gao L, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein promotes neovascularization and improves cardiac function by the Akt-glycogen synthase kinase-3[β] pathway. *Cardiovasc Res*. 2008;80:354–364.
- Emanuelli C, Bonaria Salis M, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, Pesquero JB, Bader M, Madeddu P. Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2002;105:360–366.
- Madeddu P, Emanuelli C, El-Dahr S. Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007;3:208–221.
- Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, Salmon G, Boulanger CM, Nussberger J, Crozatier B, Gasc JM, Heudes D, Bruneval P, Doetschman T, Menard J, Alhenc-Gelas F. Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2634–2639.
- Slim R, Torremocha F, Moreau T, Pizard A, Hunt SC, Vuagnat A, Williams GH, Gauthier F, Jeunemaitre X, Alhenc-Gelas F. Loss-of-function polymorphism of the human kallikrein gene with reduced urinary kallikrein activity. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:968–976.
- Azizi M, Boutouyrie P, Bissery A, Agharazii M, Verbeke F, Stern N, Bura-Riviere A, Laurent S, Alhenc-Gelas F, Jeunemaitre X. Arterial and renal consequences of partial genetic deficiency in tissue kallikrein activity in humans. *J Clin Invest*. 2005;115:780–787.
- George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, Baker AH. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther*. 1998;9:867–877.
- Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P, Dong Y, Bloch-Faure M, Inagami T, Alhenc-Gelas F, Levy BI, Boulanger CM. Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors. *Circ Res*. 2004;94:1623–1629.
- Hilgers RH, Bergaya S, Schiffrers PM, Meneton P, Boulanger CM, Henrion D, Levy BI, De Mey JG. Uterine artery structural and functional changes during pregnancy in tissue kallikrein-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1826–1832.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3120–3125.
- Raffi S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003;9:702–712.
- Bromce T, Kukkonen JP, Andersson P, Conlon JM, Larhammar D. Pharmacological characterization of ligand-receptor interactions at the zebrafish bradykinin receptor. *Br J Pharmacol*. 2005;144:11–16.
- Lawson ND, Weinstein BM. Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat Rev Genet*. 2002;3:674–682.
- van Weel V, de Vries M, Voshol PJ, Verloop RE, Eilers PH, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH. Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1383–1390.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Raffi S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625–637.
- Krankel N, Katore RG, Siragusa M, Barcelos LS, Campagnolo P, Mangialardi G, Fortunato O, Spinetti G, Tran N, Zacharowski K, Wojakowski W, Mroz I, Herman A, Manning Fox JE, MacDonald PE, Schanstra JP, Bascands JL, Ascione R, Angelini G, Emanuelli C, Madeddu P. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circ Res*. 2008;103:1335–1343.
- Chao J, Yin H, Gao L, Hagiwara M, Shen B, Yang ZR, Chao L. Tissue kallikrein elicits cardioprotection by direct kinin b2 receptor activation independent of kinin formation. *Hypertension*. 2008;52:715–720.
- Wang WY, Whittles CE, Harper SJ, Eates DO. An adenovirus-mediated gene-transfer model of angiogenesis in rat mesentery. *Microcirculation*. 2004;11:361–375.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*. 2005;97:512–523.

Bibliographie

*"si vous avez une entière confiance dans les livres,
il vaudrait mieux ne pas avoir de livres du tout"*

Meng-Tsen

1. Noël, L.-H. 2008. *Atlas de pathologie rénale*: Médecine-Sciences Flammarion.
2. Périlleux, E., Anselme, B., and Richard, D. 1999. *Biologie humaine : Anatomie, physiologie, santé*: Nathan.
3. Vander, A.J., Sherman, J.H., Luciano, D.S., and Brière, R. 1995. *Physiologie humaine*: Chenelière/McGraw-Hill.
4. Eid, A., Bodin, S., Ferrier, B., Delage, H., Boghossian, M., Martin, M., Baverel, G., and Conjard, A. 2006. Intrinsic gluconeogenesis is enhanced in renal proximal tubules of Zucker diabetic fatty rats. *J Am Soc Nephrol* 17:398-405.
5. Meguid El Nahas, A., and Bello, A.K. 2005. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 365:331-340.
6. Lysaght, M.J. 2002. Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1:S37-40.
7. Couchoud, C., Lassalle, M., Stengel, B., and Jacquelinet, C. 2009. Rapport annuel 2008 : Réseau, épidémiologie, information, néphrologie. A.d.I. biomédecine, editor.
8. Molony, D.A., and Craig, J.C. 2009. *Evidence-based nephrology*. Oxford: Wiley-Blackwell. xx, 844 p. pp.
9. Atkins, R.C., Zimmet, P., Committee, I.S.o.N.I.F.o.K.F.W.K.D.S., and Federation, I.D. 2010. Diabetic kidney disease: act now or pay later. *Acta Physiologica Hungarica* 97:52-56.
10. Segelmark, M., and Hellmark, T. 2010. Autoimmune kidney diseases. *Autoimmunity Reviews* 9:A366-371.
11. Hildebrandt, F. 2010. Genetic kidney diseases. *Lancet* 375:1287-1295.
12. Becker, A., and Baum, M. 2006. Obstructive uropathy. *Early Hum Dev* 82:15-22.
13. Yilmaz, R., and Erdem, Y. 2010. Acute kidney injury in the elderly population. *Int Urol Nephrol* 42:259-271.
14. Eknoyan, G., and Levin, N.W. 2002. Impact of the new K/DOQI guidelines. *Blood Purif* 20:103-108.
15. Blanchard, A., Poussou, R., and Houillier, P. 2009. [Exploration of renal tubular functions]. *Nephrol Ther* 5:68-83.
16. Nielsen, R., and Christensen, E.I. 2010. Proteinuria and events beyond the slit. *Pediatr Nephrol* 25:813-822.
17. Mende, C.W. 2010. Application of Direct Renin Inhibition to Chronic Kidney Disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 24:139-149.
18. Harris, D.C. 2001. Tubulointerstitial renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:303-313.
19. Wynn, T.A. 2004. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4:583-594.
20. Wynn, T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117:524-529.
21. Wynn, T.A. 2010. Fibrosis under arrest. *Nature Medicine* 16:523-525.
22. Varga, J., and Abraham, D. 2007. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 117:557-567.
23. Iredale, J.P. 2007. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 117:539-548.
24. Strieter, R.M., Gomperts, B.N., and Keane, M.P. 2007. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 117:549-556.
25. Berk, B.C., Fujiwara, K., and Lehoux, S. 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 117:568-575.

26. Eitner, F., and Floege, J. 2003. Novel insights into renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:227-232.
27. Friedlander, M. 2007. Fibrosis and diseases of the eye. *J Clin Invest* 117:576-586.
28. Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M.E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A.D., Sherwani, S., Wang, Z.V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U.J., et al. 2009. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and Cellular Biology* 29:4467-4483.
29. Quintero, A.J., Wright, V.J., Fu, F.H., and Huard, J. 2009. Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury. *Clin Sports Med* 28:1-11.
30. Sasso, F., Gulino, G., Falabella, R., D'Addessi, A., Sacco, E., D'Onofrio, A., and Bassi, P.F. 2007. Peyronie's disease: lights and shadows. *Urol Int* 78:1-9.
31. Nangaku, M. 2006. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17:17-25.
32. Araya, J., and Nishimura, S.L. 2010. Fibrogenic reactions in lung disease. *Annu Rev Pathol* 5:77-98.
33. Bohle, A., Wehrmann, M., Bogenschutz, O., Batz, C., Vogl, W., Schmitt, H., Muller, C.A., and Muller, G.A. 1992. The long-term prognosis of the primary glomerulonephritides. A morphological and clinical analysis of 1747 cases. *Pathol Res Pract* 188:908-924.
34. Chevalier, R.L., Forbes, M.S., and Thornhill, B.A. 2009. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney International* 75:1145-1152.
35. Hewitson, T.D. 2009. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F1239-1244.
36. Klahr, S., and Morrissey, J. 2002. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F861-875.
37. Strutz, F., and Neilson, E.G. 2003. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Seminars in Immunopathology* 24:459-476.
38. Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 37:14-16.
39. Mosser, D.M., and Edwards, J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
40. Ricardo, S.D., van Goor, H., and Eddy, A.A. 2008. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 118:3522-3530.
41. Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J., and Wynn, T.A. 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167:6533-6544.
42. Nishida, M., and Hamaoka, K. 2008. Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephron Exp Nephrol* 110:e31-36.
43. Kitamoto, K., Machida, Y., Uchida, J., Izumi, Y., Shiota, M., Nakao, T., Iwao, H., Yukimura, T., Nakatani, T., and Miura, K. 2009. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *J Pharmacol Sci* 111:285-292.
44. Nishida, M., Okumura, Y., Fujimoto, S.-I., Shiraishi, I., Itoi, T., and Hamaoka, K. 2005. Adoptive transfer of macrophages ameliorates renal fibrosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332:11-16.
45. Ferenbach, D., and Hughes, J. 2008. Macrophages and dendritic cells: what is the difference? *Kidney International* 74:5-7.

46. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.
47. Ilett, E.J., Prestwich, R.J.D., and Melcher, A.A. 2010. The evolving role of dendritic cells in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 10:369-379.
48. Dong, X., Swaminathan, S., Bachman, L.A., Croatt, A.J., Nath, K.A., and Griffin, M.D. 2007. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 71:619-628.
49. Connolly, M.K., Bedrosian, A.S., Mallen-St Clair, J., Mitchell, A.P., Ibrahim, J., Stroud, A., Pachter, H.L., Bar-Sagi, D., Frey, A.B., and Miller, G. 2009. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. *J Clin Invest* 119:3213-3225.
50. Krüger, T., Benke, D., Eitner, F., Lang, A., Wirtz, M., Hamilton-Williams, E.E., Engel, D., Giese, B., Müller-Newen, G., Floege, J., et al. 2004. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 15:613-621.
51. Segerer, S., Heller, F., Lindenmeyer, M.T., Schmid, H., Cohen, C.D., Draganovici, D., Mandelbaum, J., Nelson, P.J., Gröne, H.-J., Gröne, E.F., et al. 2008. Compartment specific expression of dendritic cell markers in human glomerulonephritis. *Kidney International* 74:37-46.
52. Scholz, J., Lukacs-Kornek, V., Engel, D.R., Specht, S., Kiss, E., Eitner, F., Floege, J., Groene, H.-J., and Kurts, C. 2008. Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol* 19:527-537.
53. Heymann, F., Meyer-Schwesinger, C., Hamilton-Williams, E., Hammerich, L., Panzer, U., Kaden, S., Quaggin, S., Floege, J., Gröne, H., and Kurts, C. 2009. Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest*.
54. Dong, X., Bachman, L.A., Miller, M.N., Nath, K.A., and Griffin, M.D. 2008. Dendritic cells facilitate accumulation of IL-17 T cells in the kidney following acute renal obstruction. *Kidney International* 74:1294-1309.
55. Kindt, T.J., Goldsby, R.A., and Osborne, B.A. 2008. *Immunologie*.
56. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305.
57. Matzinger, P. 2007. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature Immunology* 8:11-13.
58. Strom, T.B., and Koulmanda, M. 2009. Recently discovered T cell subsets cannot keep their commitments. *J Am Soc Nephrol* 20:1677-1680.
59. Soroosh, P., and Doherty, T.A. 2009. Th9 and allergic disease. *Immunology* 127:450-458.
60. Louten, J., Boniface, K., and de Waal Malefyt, R. 2009. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 123:1004-1011.
61. Marks, B.R., Nowyhed, H.N., Choi, J.-Y., Poholek, A.C., Odegard, J.M., Flavell, R.A., and Craft, J. 2009. Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nature Immunology* 10:1125-1132.
62. Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119:3573-3585.
63. Corthay, A. 2009. How do regulatory T cells work? *Scandinavian Journal of Immunology* 70:326-336.

64. Kotsianidis, I., Nakou, E., Bouchliou, I., Tzouvelekis, A., Spanoudakis, E., Steiropoulos, P., Sotiriou, I., Aidinis, V., Margaritis, D., Tsatalas, C., et al. 2009. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179:1121-1130.
65. Cao, Q., Wang, Y., Zheng, D., Sun, Y., Wang, Y., Lee, V.W.S., Zheng, G., Tan, T.K., Ince, J., Alexander, S.I., et al. 2010. IL-10/TGF- β -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol*.
66. Kronenberg, M., and Gapin, L. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2:557-568.
67. Hooke, D.H., Gee, D.C., and Atkins, R.C. 1987. Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis. *Kidney International* 31:964-972.
68. Shappell, S.B., Gurpinar, T., Lechago, J., Suki, W.N., and Truong, L.D. 1998. Chronic obstructive uropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice: lymphocyte infiltration is not required for progressive tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol* 9:1008-1017.
69. Mack, M., and Rosenkranz, A.R. 2009. Basophils and mast cells in renal injury. *Kidney International* 76:1142-1147.
70. Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125:S73-80.
71. Blank, U., Essig, M., Scanduzzi, L., Benhamou, M., and Kanamaru, Y. 2007. Mast cells and inflammatory kidney disease. *Immunol Rev* 217:79-95.
72. Jones, S.E., Kelly, D.J., Cox, A.J., Zhang, Y., Gow, R.M., and Gilbert, R.E. 2003. Mast cell infiltration and chemokine expression in progressive renal disease. *Kidney International* 64:906-913.
73. Kim, D.H., Moon, S.-O., Jung, Y.J., Lee, A.S., Kang, K.P., Lee, T.H., Lee, S., Chai, O.H., Song, C.H., Jang, K.Y., et al. 2009. Mast cells decrease renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney International* 75:1031-1038.
74. Miyazawa, S., Hotta, O., Doi, N., Natori, Y., Nishikawa, K., and Natori, Y. 2004. Role of mast cells in the development of renal fibrosis: use of mast cell-deficient rats. *Kidney International* 65:2228-2237.
75. Timoshanko, J.R., Kitching, R., Semple, T.J., Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. 2006. A pathogenetic role for mast cells in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17:150-159.
76. Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16:183-194.
77. Awad, A.S., Rouse, M., Huang, L., Vergis, A.L., Reutershan, J., Cathro, H.P., Linden, J., and Okusa, M.D. 2009. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney International* 75:689-698.
78. Leemans, J.C., Butter, L.M., Pulskens, W.P.C., Teske, G.J.D., Claessen, N., Van Der Poll, T., and Florquin, S. 2009. The role of Toll-like receptor 2 in inflammation and fibrosis during progressive renal injury. *PLoS ONE* 4:e5704.
79. Duymelinck, C., Dauwe, S.E., De Greef, K.E., Ysebaert, D.K., Verpooten, G.A., and De Broe, M.E. 2000. TIMP-1 gene expression and PAI-1 antigen after unilateral ureteral obstruction in the adult male rat. *Kidney International* 58:1186-1201.
80. Bennett, R.G. 2009. Relaxin and its role in the development and treatment of fibrosis. *Translational Research* 154:1-6.

81. García-Sánchez, O., López-Hernández, F.J., and López-Novoa, J.M. 2010. An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney International*.
82. Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science* 116:217-224.
83. Pohlert, D., Brenmoehl, J., Löffler, I., Müller, C.K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R.W., and Wolf, G. 2009. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 1792:746-756.
84. Cheng, S., Pollock, A.S., Mahimkar, R., Olson, J.L., and Lovett, D.H. 2006. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J* 20:1898-1900.
85. Tan, T.K., Zheng, G., Hsu, T.-T., Wang, Y., Lee, V.W.S., Tian, X., Wang, Y., Cao, Q., Wang, Y., and Harris, D.C.H. 2010. Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells. *Am J Pathol* 176:1256-1270.
86. Liu, Y. 2004. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15:1-12.
87. Yang, J., and Liu, Y. 2001. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159:1465-1475.
88. Miyajima, A., Chen, J., Lawrence, C., Ledbetter, S., Soslow, R.A., Stern, J., Jha, S., Pigato, J., Lemer, M.L., Poppas, D.P., et al. 2000. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney International* 58:2301-2313.
89. Bhaskaran, M., Reddy, K., Radhakrishnan, N., Franki, N., Ding, G., and Singhal, P.C. 2003. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F955-965.
90. Isaka, Y., Tsujie, M., Ando, Y., Nakamura, H., Kaneda, Y., Imai, E., and Hori, M. 2000. Transforming growth factor-beta 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 58:1885-1892.
91. Böttinger, E.P., Letterio, J.J., and Roberts, A.B. 1997. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney International* 51:1355-1360.
92. Kawaki, H., Kubota, S., Suzuki, A., Yamada, T., Matsumura, T., Mandai, T., Yao, M., Maeda, T., Lyons, K.M., and Takigawa, M. 2008. Functional requirement of CCN2 for intramembranous bone formation in embryonic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366:450-456.
93. Phanish, M.K., Winn, S.K., and Dockrell, M.E.C. 2010. Connective Tissue Growth Factor-(CTGF, CCN2) - A Marker, Mediator and Therapeutic Target for Renal Fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 114:e83-e92.
94. Wang, S., Denichilo, M., Brubaker, C., and Hirschberg, R. 2001. Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy. *Kidney International* 60:96-105.
95. Yokoi, H., Mukoyama, M., Sugawara, A., Mori, K., Nagae, T., Makino, H., Suganami, T., Yahata, K., Fujinaga, Y., Tanaka, I., et al. 2002. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F933-942.
96. Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T., and Takehara, K. 1999. Role and interaction of

- connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 181:153-159.
97. Pradère, J., Gonzalez, J., Klein, J., Valet, P., Grès, S., Salant, D., Bascands, J., Saulnier-Blache, J., and Schanstra, J. 2008. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta*.
 98. Pradère, J.-P., Klein, J., Grès, S., Guigné, C., Neau, E., Valet, P., Calise, D., Chun, J., Bascands, J.-L., Saulnier-Blache, J.-S., et al. 2007. LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 18:3110-3118.
 99. Floege, J., Eitner, F., and Alpers, C.E. 2008. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 19:12-23.
 100. Bonner, J.C. 2004. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:255-273.
 101. Tang, W.W., Ulich, T.R., Lacey, D.L., Hill, D.C., Qi, M., Kaufman, S.A., Van, G.Y., Tarpley, J.E., and Yee, J.S. 1996. Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 148:1169-1180.
 102. Eitner, F., Bücher, E., van Roeyen, C., Kunter, U., Rong, S., Seikrit, C., Villa, L., Boor, P., Fredriksson, L., Bäckström, G., et al. 2008. PDGF-C is a proinflammatory cytokine that mediates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 19:281-289.
 103. Boor, P., Konieczny, A., Villa, L., Kunter, U., van Roeyen, C.R.C., LaRochelle, W.J., Smithson, G., Arrol, S., Ostendorf, T., and Floege, J. 2007. PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 22:1323-1331.
 104. Ludewig, D., Kosmehl, H., Sommer, M., Bohmer, F.D., and Stein, G. 2000. PDGF receptor kinase blocker AG1295 attenuates interstitial fibrosis in rat kidney after unilateral obstruction. *Cell Tissue Res* 299:97-103.
 105. Kharitonov, A. 2009. FGFs and metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 9:805-810.
 106. Strutz, F., Zeisberg, M., Hemmerlein, B., Sattler, B., Hummel, K., Becker, V., and Müller, G.A. 2000. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney International* 57:1521-1538.
 107. Strutz, F., Zeisberg, M., Renziehausen, A., Raschke, B., Becker, V., van Kooten, C., and Müller, G. 2001. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney International* 59:579-592.
 108. Seiler, S., Heine, G.H., and Fliser, D. 2009. Clinical relevance of FGF-23 in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*:S34-42.
 109. Hong, C.C., and Yu, P.B. 2009. Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:409-418.
 110. Zhang, Y., and Zhang, Q. 2009. Bone morphogenetic protein-7 and Gremlin: New emerging therapeutic targets for diabetic nephropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383:1-3.
 111. Zeisberg, M., and Kalluri, R. 2004. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 82:175-181.
 112. Granjeiro, J.M., Oliveira, R.C., Bustos-Valenzuela, J.C., Sogayar, M.C., and Taga, R. 2005. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 38:1463-1473.
 113. Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. 1997. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389:622-626.

114. Archdeacon, P., and Detwiler, R.K. 2008. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7): a critical role in kidney development and a putative modulator of kidney injury. *Advances in chronic kidney disease* 15:314-320.
115. Gould, S.E., Day, M., Jones, S.S., and Dorai, H. 2002. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney International* 61:51-60.
116. Hruska, K.A., Guo, G., Wozniak, M., Martin, D., Miller, S., Liapis, H., Loveday, K., Klahr, S., Sampath, T.K., and Morrissey, J. 2000. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F130-143.
117. Morrissey, J., Hruska, K., Guo, G., Wang, S., Chen, Q., and Klahr, S. 2002. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1:S14-21.
118. Matsumoto, K., Mizuno, S., and Nakamura, T. 2000. Hepatocyte growth factor in renal regeneration, renal disease and potential therapeutics. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:395-402.
119. Vargas, G.A., Hoeflich, A., and Jehle, P.M. 2000. Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. *Kidney International* 57:1426-1436.
120. Liu, Y. 2004. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F7-16.
121. Liu, Y., and Yang, J. 2006. Hepatocyte growth factor: new arsenal in the fights against renal fibrosis? *Kidney International* 70:238-240.
122. Mizuno, S., Matsumoto, K., and Nakamura, T. 2001. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney International* 59:1304-1314.
123. Gao, X., Mae, H., Ayabe, N., Takai, T., Oshima, K., Hattori, M., Ueki, T., Fujimoto, J., and Tanizawa, T. 2002. Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney International* 62:1238-1248.
124. Yang, J., and Liu, Y. 2003. Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F349-357.
125. Grande, M.T., and López-Novoa, J.M. 2009. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 5:319-328.
126. Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B.J., Ryan, G.B., and Statkov, P.R. 1971. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173:548-550.
127. Hinz, B. 2010. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics* 43:146-155.
128. Darby, I.A., and Hewitson, T.D. 2007. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 257:143-179.
129. Eyden, B. 2008. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med* 12:22-37.
130. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349-363.
131. Hinz, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127:526-537.
132. Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., and Gabbiani, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170:1807-1816.

133. Takeji, M., Moriyama, T., Oseto, S., Kawada, N., Hori, M., Imai, E., and Miwa, T. 2006. Smooth muscle alpha-actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis. *J Biol Chem* 281:40193-40200.
134. Bechtel, W., Mcgoohan, S., Zeisberg, E.M., Müller, G.A., Kalbacher, H., Salant, D.J., Müller, C.A., Kalluri, R., and Zeisberg, M. 2010. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nature Medicine*.
135. Kalluri, R., and Zeisberg, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:392-401.
136. Chang, H.Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P.O. 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12877-12882.
137. Qi, W., Chen, X., Poronnik, P., and Pollock, C.A. 2006. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1-5.
138. Lemley, K.V., and Kriz, W. 1991. Anatomy of the renal interstitium. *Kidney International* 39:370-381.
139. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871-890.
140. Kalluri, R., and Weinberg, R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420-1428.
141. Liu, Y. 2009. New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*.
142. Yang, L., Besschetnova, T.Y., Brooks, C.R., Shah, J.V., and Bonventre, J.V. 2010. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nature Medicine*.
143. Guarino, M., Tosoni, A., and Nebuloni, M. 2009. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology* 40:1365-1376.
144. Kalluri, R., and Neilson, E.G. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112:1776-1784.
145. Iwano, M., and Neilson, E.G. 2004. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:279-284.
146. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110:341-350.
147. Burns, W.C., Twigg, S.M., Forbes, J.M., Pete, J., Tikellis, C., Thallas-Bonke, V., Thomas, M.C., Cooper, M.E., and Kantharidis, P. 2006. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2484-2494.
148. Liu, Y., Rajur, K., Tolbert, E., and Dworkin, L.D. 2000. Endogenous hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal injury by activating matrix degradation pathways. *Kidney International* 58:2028-2043.
149. Zeisberg, M., Hanai, J.-i., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine* 9:964-968.
150. Djamali, A., Reese, S., Yracheta, J., Oberley, T., Hullett, D., and Becker, B. 2005. Epithelial-to-mesenchymal transition and oxidative stress in chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant* 5:500-509.
151. Humphreys, B.D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Bonventre, J.V., Valerius, M.T., McMahon, A.P., and Duffield, J.S. 2010. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176:85-97.

152. Frid, M.G., Kale, V.A., and Stenmark, K.R. 2002. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 90:1189-1196.
153. Jacquemin, P., Yoshitomi, H., Kashima, Y., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., and Zaret, K.S. 2006. An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Dev Biol* 290:189-199.
154. Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., et al. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine* 13:952-961.
155. Zeisberg, E.M., Potenta, S.E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. 2008. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19:2282-2287.
156. Li, J., Qu, X., and Bertram, J.F. 2009. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol* 175:1380-1388.
157. Bellini, A., and Mattoli, S. 2007. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* 87:858-870.
158. Quan, T.E., Cowper, S., Wu, S.-P., Bockenstedt, L.K., and Bucala, R. 2004. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 36:598-606.
159. Sakai, N., Wada, T., Yokoyama, H., Lipp, M., Ueha, S., Matsushima, K., and Kaneko, S. 2006. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14098-14103.
160. Sakai, N., Wada, T., Matsushima, K., Bucala, R., Iwai, M., Horiuchi, M., and Kaneko, S. 2008. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens* 26:780-790.
161. Hall, A.P. 2006. Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy. *Toxicol Pathol* 34:763-775.
162. Corselli, M., Chen, C.-W., Crisan, M., Lazzari, L., and Péault, B. 2010. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30:1104-1109.
163. Lin, S.-L., Kisseleva, T., Brenner, D.A., and Duffield, J.S. 2008. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol* 173:1617-1627.
164. Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., and Penttinen, R. 2009. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* 61:198-223.
165. Baumann, L. 2002. Cosmetic dermatology: principles and practice.
166. Hynes, R.O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326:1216-1219.
167. Alexakis, C., Maxwell, P., and Bou-Gharios, G. 2006. Organ-specific collagen expression: implications for renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 102:e71-75.
168. Gordon, M.K., and Hahn, R.A. 2010. Collagens. *Cell Tissue Res* 339:247-257.
169. Schéele, S., Nyström, A., Durbeej, M., Talts, J.F., Ekblom, M., and Ekblom, P. 2007. Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med* 85:825-836.
170. Hynes, R.O., and Yamada, K.M. 1982. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *The Journal of Cell Biology* 95:369-377.
171. White, E.S., Baralle, F.E., and Muro, A.F. 2008. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J. Pathol.* 216:1-14.

172. Grande, M.T., Fuentes-Calvo, I., Arévalo, M., Heredia, F., Santos, E., Martínez-Salgado, C., Rodríguez-Puyol, D., Nieto, M.A., and López-Novoa, J.M. 2010. Deletion of H-Ras decreases renal fibrosis and myofibroblast activation following ureteral obstruction in mice. *Kidney International* 77:509-518.
173. Pang, M., Kothapally, J., Mao, H., Tolbert, E., Ponnusamy, M., Chin, Y.E., and Zhuang, S. 2009. Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F996-F1005.
174. Gonzalez, J., Klein, J., Chauhan, S.D., Neau, E., Calise, D., Nevoit, C., Chaaya, R., Miravete, M., Delage, C., Bascands, J.-L., et al. 2009. Delayed treatment with plasminogen activator inhibitor-1 decoys reduces tubulointerstitial fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 234:1511-1518.
175. Gonzalez, J., Mouttalib, S., Miravete, M., Delage, C., Calise, D., Maoret, J.-J., Pradère, J.-P., Klein, J., Van der Veen, B., Charo, I., et al. submitted. Differential effects of chemokine CCL7/MCP-3 in the development of renal fibrosis.
176. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. *Molecular biology of the cell, 4th edition*.
177. Cooper, G.M. 2000. *The cell: A molecular approach*.
178. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, d., and Darnell, J. 2000. *Molecular cell biology*.
179. Chen, Q., Sivakumar, P., Barley, C., Peters, D.M., Gomes, R.R., Farach-Carson, M.C., and Dallas, S.L. 2007. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *J Biol Chem* 282:26418-26430.
180. Rüster, C., and Wolf, G. 2006. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2985-2991.
181. Fyhrquist, F., and Saijonmaa, O. 2008. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264:224-236.
182. Bader, M., and Ganten, D. 2008. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med* 86:615-621.
183. Wolf, G., Wenzel, U., Burns, K.D., Harris, R.C., Stahl, R.A.K., and Thaiss, F. 2002. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney International* 61:1986-1995.
184. Efrati, S., Berman, S., Goldfinger, N., Erez, N., Averbukh, Z., Golik, A., Rotter, V., and Weissgarten, J. 2007. Enhanced angiotensin II production by renal mesangium is responsible for apoptosis/proliferation of endothelial and epithelial cells in a model of malignant hypertension. *J Hypertens* 25:1041-1052.
185. Weidekamm, C., Hauser, P., Hansmann, C., Schwarz, C., Klingler, H., Mayer, G., and Oberbauer, R. 2002. Effects of AT1 and AT2 receptor blockade on angiotensin II induced apoptosis of human renal proximal tubular epithelial cells. *Wien Klin Wochenschr* 114:725-729.
186. Wolf, G. 2006. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney International* 70:1914-1919.
187. Yang, F., Chung, A.C.K., Huang, X.R., and Lan, H.Y. 2009. Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent Smad pathways: the role of Smad3. *Hypertension* 54:877-884.
188. Schüttert, J.B., Liu, M.H., Gliem, N., Fiedler, G.M., Zopf, S., Mayer, C., Müller, G.A., and Grunewald, R.W. 2003. Human renal fibroblasts derived from normal and

- fibrotic kidneys show differences in increase of extracellular matrix synthesis and cell proliferation upon angiotensin II exposure. *Pflugers Arch* 446:387-393.
189. Laight, D.W. 2009. Therapeutic inhibition of the renin angiotensin aldosterone system. *Expert Opin Ther Pat* 19:753-759.
 190. Naito, T., Ma, L.-J., Yang, H., Zuo, Y., Tang, Y., Han, J.Y., Kon, V., and Fogo, A.B. 2010. Angiotensin type 2 receptor actions contribute to angiotensin type 1 receptor blocker effects on kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F683-691.
 191. Unger, T., and Dahlöf, B. 2010. Compound 21, the first orally active, selective agonist of the angiotensin type 2 receptor (AT2): implications for AT2 receptor research and therapeutic potential. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11:75-77.
 192. Costa-Neto, C.M., Dillenburg-Pilla, P., Heinrich, T.A., Parreiras-e-Silva, L.T., Pereira, M.G.A.G., Reis, R.I., and Souza, P.P.C. 2008. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *International Immunopharmacology* 8:135-142.
 193. Kakoki, M., and Smithies, O. 2009. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. *Kidney International* 75:1019-1030.
 194. Moreau, M.E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N.J., Marceau, F., and Adam, A. 2005. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 99:6-38.
 195. Buléon, M., Allard, J., Jaafar, A., Praddaude, F., Dickson, Z., Ranera, M.-T., Pecher, C., Girolami, J.-P., and Tack, I. 2008. Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F1249-1256.
 196. Fujii, M., Wada, A., Ohnishi, M., Tsutamoto, T., Matsumoto, T., Yamamoto, T., Takayama, T., Dohke, T., Isono, T., Eguchi, Y., et al. 2004. Endogenous bradykinin suppresses myocardial fibrosis through the cardiac-generated endothelin system under chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1:S346-349.
 197. Sharma, J.N., and Abbas, S.A. 2005. A bradykinin antagonist abolishes beneficial effect of captopril on duration of survival after acute coronary artery ligation in hypertensive rats. *Pharmacol Res* 52:211-215.
 198. Klein, J., Gonzalez, J., Duchene, J., Esposito, L., re, J.P.P., Neau, E., Delage, C., Calise, D., Ahluwalia, A., Carayon, P., et al. 2009. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J* 23:134-142.
 199. Klein, J., Gonzalez, J., Decramer, S., Bandin, F., Neau, E., Salant, D.J., Heeringa, P., Pesquero, J.-B., Schanstra, J.-P., and Bascands, J.-L. 2010. Blockade of the Kinin B1 Receptor Ameliorates Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*.
 200. Eddy, A.A., and Fogo, A.B. 2006. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 17:2999-3012.
 201. Eddy, A.A. 2002. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F209-220.
 202. Eddy, A.A. 2009. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. *Thromb Haemost* 101:656-664.
 203. Oda, T., Jung, Y.O., Kim, H.S., Cai, X., López-Guisa, J.M., Ikeda, Y., and Eddy, A.A. 2001. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney International* 60:587-596.
 204. Matsuo, S., López-Guisa, J.M., Cai, X., Okamura, D.M., Alpers, C.E., Bumgarner, R.E., Peters, M.A., Zhang, G., and Eddy, A.A. 2005. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney International* 67:2221-2238.

205. Huang, Y., Border, W.A., Yu, L., Zhang, J., Lawrence, D.A., and Noble, N.A. 2008. A PAI-1 mutant, PAI-1R, slows progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19:329-338.
206. Huang, Y., Haraguchi, M., Lawrence, D.A., Border, W.A., Yu, L., and Noble, N.A. 2003. A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 112:379-388.
207. Mimuro, J., Kaneko, M., Murakami, T., Matsuda, M., and Sakata, Y. 1992. Reversible interactions between plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biochim Biophys Acta* 1160:325-334.
208. Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221-233.
209. Cheng, S., and Lovett, D.H. 2003. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 162:1937-1949.
210. Brew, K., and Nagase, H. 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 1803:55-71.
211. Catania, J.M., Chen, G., and Parrish, A.R. 2007. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F905-911.
212. Verderio, E.A.M., Johnson, T., and Griffin, M. 2004. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino Acids* 26:387-404.
213. Skill, N.J., Johnson, T.S., Coutts, I.G.C., Saint, R.E., Fisher, M., Huang, L., El Nahas, A.M., Collighan, R.J., and Griffin, M. 2004. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. *J Biol Chem* 279:47754-47762.
214. Huang, L., Haylor, J.L., Hau, Z., Jones, R.A., Vickers, M.E., Wagner, B., Griffin, M., Saint, R.E., Coutts, I.G.C., El Nahas, A.M., et al. 2009. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney International* 76:383-394.
215. Shweke, N., Boulos, N., Jouanneau, C., Vandermeersch, S., Melino, G., Dussaule, J.-C., Chatziantoniou, C., Ronco, P., and Boffa, J.-J. 2008. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. *Am J Pathol* 173:631-642.
216. Li, L., Zepeda-Orozco, D., Black, R., and Lin, F. 2010. Autophagy Is a Component of Epithelial Cell Fate in Obstructive Uropathy. *Am J Pathol*.
217. Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., and Menini, A. 2009. From pheromones to behavior. *Physiol Rev* 89:921-956.
218. Havlicek, J., and Roberts, S.C. 2009. MHC-correlated mate choice in humans: a review. *Psychoneuroendocrinology* 34:497-512.
219. Drews, G. 2005. Contributions of Theodor Wilhelm Engelmann on phototaxis, chemotaxis, and photosynthesis. *Photosynth Res* 83:25-34.
220. Councilman, W.T. 1898. ACUTE INTERSTITIAL NEPHRITIS. *J Exp Med* 3:393-420.
221. Wolf, E.P. 1921. EXPERIMENTAL STUDIES ON INFLAMMATION : I. THE INFLUENCE OF CHEMICALS UPON THE CHEMOTAXIS OF LEUCOCYTES IN VITRO. *J Exp Med* 34:375-396.
222. Wolf, E.P. 1923. Experimental Studies on Inflammation : Ii. Experimental Chemical Inflammation in Vivo. *J Exp Med* 37:511-524.
223. Deuel, T.F., Keim, P.S., Farmer, M., and Heinrikson, R.L. 1977. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2256-2258.

224. Luster, A.D., Unkeless, J.C., and Ravetch, J.V. 1985. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315:672-676.
225. Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J., and Leonard, E.J. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9233-9237.
226. Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E., Kuratsu, J., and Leonard, E.J. 1989. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 169:1449-1459.
227. Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, G.C., and Oppenheim, J.J. 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 169:1485-1490.
228. Wolpe, S.D., Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Moldawer, L.L., Nathan, C.F., Lowry, S.F., and Cerami, A. 1988. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 167:570-581.
229. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., et al. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-673.
230. Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., et al. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-666.
231. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
232. Zlotnik, A., and Yoshie, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.
233. Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84:1045-1049.
234. Laing, K.J., and Secombes, C.J. 2004. Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28:443-460.
235. Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J.A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., et al. 1997. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387:611-617.
236. Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T.J., et al. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91:521-530.
237. Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25:787-820.
238. Lau, E.K., Allen, S., Hsu, A.R., and Handel, T.M. 2004. Chemokine-receptor interactions: GPCRs, glycosaminoglycans and viral chemokine binding proteins. *Adv Protein Chem* 68:351-391.
239. Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G.J., Segerer, S., Nibbs, R.J.B., et al. 2009. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol* 10:101-108.

240. Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. 1997. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91:385-395.
241. Tanaka, Y., Adams, D.H., and Shaw, S. 1993. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* 14:111-115.
242. Fernandez, E.J., and Lolis, E. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:469-499.
243. Gerard, C., and Rollins, B.J. 2001. Chemokines and disease. *Nature Immunology* 2:108-115.
244. Luster, A.D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445.
245. Rollins, B.J. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909-928.
246. Sallusto, F., and Baggiolini, M. 2008. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol* 9:949-952.
247. Thelen, M., and Stein, J.V. 2008. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol* 9:953-959.
248. Adams, D.H., and Lloyd, A.R. 1997. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349:490-495.
249. Moldobaeva, A., Baek, A., Eldridge, L., and Wagner, E.M. 2010. Differential activity of pro-angiogenic CXC chemokines. *Microvascular Research* 80:18-22.
250. Gharaee-Kermani, M., Denholm, E.M., and Phan, S.H. 1996. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 271:17779-17784.
251. Keller, J.R., Bartelmez, S.H., Sitnicka, E., Ruscetti, F.W., Ortiz, M., Gooya, J.M., and Jacobsen, S.E. 1994. Distinct and overlapping direct effects of macrophage inflammatory protein-1 alpha and transforming growth factor beta on hematopoietic progenitor/stem cell growth. *Blood* 84:2175-2181.
252. Loetscher, P., and Clark-Lewis, I. 2001. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol* 69:881-884.
253. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
254. Chow, F.Y., Nikolic-Paterson, D.J., Ozols, E., Atkins, R.C., Rollin, B.J., and Tesch, G.H. 2006. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney International* 69:73-80.
255. Kitagawa, K., Wada, T., Furuichi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Takeya, M., Kuziel, W.A., Matsushima, K., Mukaida, N., et al. 2004. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol* 165:237-246.
256. Song, E., Zou, H., Yao, Y., Proudfoot, A., Antus, B., Liu, S., Jens, L., and Heemann, U. 2002. Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney International* 61:676-685.
257. Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Iwata, Y., Kitagawa, K., Ishida, Y., Kondo, T., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Mukaida, N., et al. 2004. Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 15:940-948.
258. Lodowski, D.T., and Palczewski, K. 2009. Chemokine receptors and other G protein-coupled receptors. *Curr Opin HIV AIDS* 4:88-95.
259. Thelen, M., Muñoz, L.M., Rodríguez-Frade, J.M., and Mellado, M. 2010. Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. *Curr Opin Pharmacol* 10:38-43.
260. Bouvier, M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2:274-286.
261. Terrillon, S., and Bouvier, M. 2004. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5:30-34.

262. Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288-294.
263. Agrawal, L., Lu, X., Qingwen, J., VanHorn-Ali, Z., Nicolescu, I.V., McDermott, D.H., Murphy, P.M., and Alkhatib, G. 2004. Role for CCR5Delta32 protein in resistance to R5, R5X4, and X4 human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4+ cells. *J Virol* 78:2277-2287.
264. McGraw, D.W., Mhibachler, K.A., Schwarb, M.R., Rahman, F.F., Small, K.M., Almoosa, K.F., and Liggett, S.B. 2006. Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest* 116:1400-1409.
265. Kinashi, T. 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5:546-559.
266. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.
267. Lee, H.-S., Lim, C.J., Puzon-McLaughlin, W., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. 2008. RIAM Activates Integrins by Linking Talin to Ras GTPase Membrane-targeting Sequences. *Journal of Biological Chemistry* 284:5119-5127.
268. Andrews, S., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. 2007. PI3K class IB pathway. *Sci STKE* 2007:cm2.
269. Curnock, A.P., Logan, M.K., and Ward, S.G. 2002. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* 105:125-136.
270. Ghigo, A., Damilano, F., Braccini, L., and Hirsch, E. 2010. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *BioEssays* 32:185-196.
271. Hirsch, E., Lembo, G., Montrucchio, G., Rommel, C., Costa, C., and Barberis, L. 2006. Signaling through PI3Kgamma: a common platform for leukocyte, platelet and cardiovascular stress sensing. *Thromb Haemost* 95:29-35.
272. Rückle, T., Schwarz, M.K., and Rommel, C. 2006. PI3Kgamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'? *Nat Rev Drug Discov* 5:903-918.
273. Hayer, S., Pundt, N., Peters, M.A., Wunrau, C., Kühnel, I., Neugebauer, K., Strietholt, S., Zwerina, J., Korb, A., Penninger, J., et al. 2009. PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis. *FASEB J* 23:4288-4298.
274. Van Haastert, P.J.M., and Devreotes, P.N. 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:626-634.
275. Janetopoulos, C., and Firtel, R.A. 2008. Directional sensing during chemotaxis. *FEBS Letters* 582:2075-2085.
276. Barber, D.F., Bartolomé, A., Hernandez, C., Flores, J.M., Redondo, C., Fernandez-Arias, C., Camps, M., Rückle, T., Schwarz, M.K., Rodríguez, S., et al. 2005. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* 11:933-935.
277. Schreiber, A., Rolle, S., Peripelittchenko, L., Rademann, J., Schneider, W., Luft, F.C., and Kettritz, R. 2010. Phosphoinositol 3-kinase-gamma mediates antineutrophil cytoplasmic autoantibody-induced glomerulonephritis. *Kidney International* 77:118-128.
278. Nibbs, R., Graham, G., and Rot, A. 2003. Chemokines on the move: control by the chemokine "interceptors" Duffy blood group antigen and D6. *Semin Immunol* 15:287-294.
279. Graham, G.J. 2009. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur. J. Immunol.* 39:342-351.
280. Graham, G.J., and McKimmie, C.S. 2006. Chemokine scavenging by D6: a movable feast? *Trends in Immunology* 27:381-386.

281. Comerford, I., Litchfield, W., Harata-Lee, Y., Nibbs, R.J.B., and Mccoll, S.R. 2007. Regulation of chemotactic networks by 'atypical' receptors. *Bioessays* 29:237-247.
282. Galliera, E., Jala, V.R., Trent, J.O., Bonecchi, R., Signorelli, P., Lefkowitz, R.J., Mantovani, A., Locati, M., and Haribabu, B. 2004. beta-Arrestin-dependent constitutive internalization of the human chemokine decoy receptor D6. *J Biol Chem* 279:25590-25597.
283. McCulloch, C.V., Morrow, V., Milasta, S., Comerford, I., Milligan, G., Graham, G.J., Isaacs, N.W., and Nibbs, R.J.B. 2008. Multiple roles for the C-terminal tail of the chemokine scavenger D6. *J Biol Chem* 283:7972-7982.
284. Fra, A.M., Locati, M., Otero, K., Sironi, M., Signorelli, P., Massardi, M.L., Gobbi, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Mantovani, A. 2003. Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol* 170:2279-2282.
285. Weber, M., Blair, E., Simpson, C.V., O'Hara, M., Blackburn, P.E., Rot, A., Graham, G.J., and Nibbs, R.J. 2004. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. *Mol Biol Cell* 15:2492-2508.
286. Sánchez-Sánchez, N., Riol-Blanco, L., and Rodríguez-Fernández, J.L. 2006. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 176:5153-5159.
287. Nibbs, R.J.B., Gilchrist, D.S., King, V., Ferra, A., Forrow, S., Hunter, K.D., and Graham, G.J. 2007. The atypical chemokine receptor D6 suppresses the development of chemically induced skin tumors. *J. Clin. Invest.* 117:1884-1892.
288. Cutbush, M., Mollison, P.L., and Parkin, D.M. 1950. A new Human blood group. *Nature* 165:188-189.
289. Miller, L.H., Mason, S.J., Dvorak, J.A., McGinniss, M.H., and Rothman, I.K. 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 189:561-563.
290. Tournamille, C. 2000. [Molecular basis and structure-activity relationships of the Duffy blood group antigens: chemokine and *Plasmodium vivax* receptors]. *Transfus Clin Biol* 7:497-509.
291. Darbonne, W.C., Rice, G.C., Mohler, M.A., Apple, T., Hébert, C.A., Valente, A.J., and Baker, J.B. 1991. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 88:1362-1369.
292. Chaudhuri, A., Zbrzezna, V., Polyakova, J., Pogo, A.O., Hesselgesser, J., and Horuk, R. 1994. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 269:7835-7838.
293. Du, J., Luan, J., Liu, H., Daniel, T.O., Peiper, S., Chen, T.S., Yu, Y., Horton, L.W., Nanney, L.B., Strieter, R.M., et al. 2002. Potential role for Duffy antigen chemokine-binding protein in angiogenesis and maintenance of homeostasis in response to stress. *J Leukoc Biol* 71:141-153.
294. Chakera, A., Seeber, R.M., John, A.E., Eidne, K.A., and Greaves, D.R. 2008. The duffy antigen/receptor for chemokines exists in an oligomeric form in living cells and functionally antagonizes CCR5 signaling through hetero-oligomerization. *Mol Pharmacol* 73:1362-1370.
295. Comerford, I., Milasta, S., Morrow, V., Milligan, G., and Nibbs, R. 2006. The chemokine receptor CCX-CKR mediates effective scavenging of CCL19 in vitro. *Eur. J. Immunol.* 36:1904-1916.
296. Hansell, C.A.H., Simpson, C.V., and Nibbs, R.J.B. 2006. Chemokine sequestration by atypical chemokine receptors. *Biochem Soc Trans* 34:1009-1013.

297. Maksym, R.B., Tarnowski, M., Grymula, K., Tarnowska, J., Wysoczynski, M., Liu, R., Czerny, B., Ratajczak, J., Kucia, M., and Ratajczak, M.Z. 2009. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *European Journal of Pharmacology* 625:31-40.
298. Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. 2008. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132:463-473.
299. Neusser, M.A., Kraus, A.K., Regele, H., Cohen, C.D., Fehr, T., Kerjaschki, D., Wüthrich, R.P., Penfold, M.E.T., Schall, T., and Segerer, S. 2010. The chemokine receptor CXCR7 is expressed on lymphatic endothelial cells during renal allograft rejection. *Kidney International*.
300. Miao, Z., Luker, K.E., Summers, B.C., Berahovich, R., Bhojani, M.S., Rehemtulla, A., Kleer, C.G., Essner, J.J., Nasevicius, A., Luker, G.D., et al. 2007. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15735-15740.
301. Sierro, F., Biben, C., Martínez-Muñoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R.M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., et al. 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14759-14764.
302. Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E.T., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., et al. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203:2201-2213.
303. Beisser, P.S., Lavreysen, H., Bruggeman, C.A., and Vink, C. 2008. Chemokines and chemokine receptors encoded by cytomegaloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:221-242.
304. Arenzana-Seisdedos, F., and Parmentier, M. 2006. Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol* 18:387-403.
305. Lusso, P. 2006. HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 25:447-456.
306. Blanpain, C., Migeotte, I., Lee, B., Vakili, J., Doranz, B.J., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R.W., and Parmentier, M. 1999. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 94:1899-1905.
307. Stokman, G., Stroo, I., Claessen, N., Teske, G.J.D., Florquin, S., and Leemans, J.C. 2010. SDF-1 provides morphological and functional protection against renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*.
308. Furuichi, K., Gao, J.-L., and Murphy, P.M. 2006. Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 169:372-387.
309. Eis, V., Vielhauer, V., and Anders, H.J. 2004. Targeting the chemokine network in renal inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52:164-172.
310. Segerer, S., Nelson, P.J., and Schlöndorff, D. 2000. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11:152-176.
311. Wu, H., Wang, Y., Tay, Y.-C., Zheng, G., Zhang, C., Alexander, S.I., and Harris, D.C.H. 2005. DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin nephropathy. *Kidney International* 67:2178-2186.
312. Lloyd, C.M., Minto, A.W., Dorf, M.E., Proudfoot, A., Wells, T.N., Salant, D.J., and Gutierrez-Ramos, J.C. 1997. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but

- only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 185:1371-1380.
313. Schneider, A., Panzer, U., Zahner, G., Wenzel, U., Wolf, G., Thaiss, F., Helmchen, U., and Stahl, R.A. 1999. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney International* 56:135-144.
 314. Clauss, S., Gross, O., Kulkarni, O., Avila-Ferrufino, A., Radomska, E., Segerer, S., Eulberg, D., Klusmann, S., and Anders, H.-J. 2009. Ccl2/Mcp-1 blockade reduces glomerular and interstitial macrophages but does not ameliorate renal pathology in collagen4A3-deficient mice with autosomal recessive Alport nephropathy. *J. Pathol.* 218:40-47.
 315. Tesch, G.H., Schwarting, A., Kinoshita, K., Lan, H.Y., Rollins, B.J., and Kelley, V.R. 1999. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest* 103:73-80.
 316. Furuichi, K., Wada, T., Iwata, Y., Kitagawa, K., Kobayashi, K.-I., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Wang, H., Matsushima, K., et al. 2003. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol* 14:2503-2515.
 317. Li, L., Huang, L., Sung, S.-S.J., Vergis, A.L., Rosin, D.L., Rose, C.E., Lobo, P.I., and Okusa, M.D. 2008. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney International* 74:1526-1537.
 318. Krensky, A.M., and Ahn, Y.-T. 2007. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nature clinical practice Nephrology* 3:164-170.
 319. Keepers, T.R., Gross, L.K., and Obrig, T.G. 2007. Monocyte Chemoattractant Protein 1, Macrophage Inflammatory Protein 1 , and RANTES Recruit Macrophages to the Kidney in a Mouse Model of Hemolytic-Uremic Syndrome. *Infection and Immunity* 75:1229-1236.
 320. Ninichuk, V., and Anders, H.-J. 2005. Chemokine receptor CCR1: a new target for progressive kidney disease. *Am J Nephrol* 25:365-372.
 321. Anders, H.-J., Vielhauer, V., Frink, M., Linde, Y., Cohen, C.D., Blattner, S.M., Kretzler, M., Strutz, F., Mack, M., Gröne, H.-J., et al. 2002. A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* 109:251-259.
 322. Furuichi, K., Gao, J.-L., Horuk, R., Wada, T., Kaneko, S., and Murphy, P.M. 2008. Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 181:8670-8676.
 323. Vielhauer, V., Berning, E., Eis, V., Kretzler, M., Segerer, S., Strutz, F., Horuk, R., Gröne, H.-J., Schlöndorff, D., and Anders, H.-J. 2004. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney International* 66:2264-2278.
 324. Ninichuk, V., Gross, O., Reichel, C., Khandoga, A., Pawar, R.D., Ciubar, R., Segerer, S., Belemzova, E., Radomska, E., Luckow, B., et al. 2005. Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease. *J Am Soc Nephrol* 16:977-985.
 325. Komai, M., Tanaka, H., Nagao, K., Ishizaki, M., Kajiwar, D., Miura, T., Ohashi, H., Haba, T., Kawakami, K., Sawa, E., et al. 2010. A novel CC-chemokine receptor 3 antagonist, Ki19003, inhibits airway eosinophilia and subepithelial/peribronchial fibrosis induced by repeated antigen challenge in mice. *J Pharmacol Sci* 112:203-213.

326. Turner, J.-E., Paust, H.-J., Steinmetz, O.M., Peters, A., Meyer-Schwesinger, C., Heymann, F., Helmchen, U., Fehr, S., Horuk, R., Wenzel, U., et al. 2008. CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice. *J Immunol* 181:6546-6556.
327. Menten, P., Wuyts, A., and Van Damme, J. 2001. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw* 12:554-560.
328. Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J.P., and Opdenakker, G. 1992. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 176:59-65.
329. Almendral, J.M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., and Bravo, R. 1988. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 8:2140-2148.
330. Heinrich, J.N., Ryseck, R.P., Macdonald-Bravo, H., and Bravo, R. 1993. The product of a novel growth factor-activated gene, fic, is a biologically active "C-C"-type cytokine. *Molecular and Cellular Biology* 13:2020-2030.
331. Kulmburg, P.A., Huber, N.E., Scheer, B.J., Wrann, M., and Baumruker, T. 1992. Immunoglobulin E plus antigen challenge induces a novel intercrine/chemokine in mouse mast cells. *J Exp Med* 176:1773-1778.
332. Kim, K.S., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., and Sykes, B.D. 1996. Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3. *FEBS Letters* 395:277-282.
333. Meunier, S., Bernassau, J.M., Guillemot, J.C., Ferrara, P., and Darbon, H. 1997. Determination of the three-dimensional structure of CC chemokine monocyte chemoattractant protein 3 by 1H two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 36:4412-4422.
334. Combadiere, C., Ahuja, S.K., Van Damme, J., Tiffany, H.L., Gao, J.L., and Murphy, P.M. 1995. Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J Biol Chem* 270:29671-29675.
335. Ponath, P.D., Qin, S., Ringler, D.J., Clark-Lewis, I., Wang, J., Kassam, N., Smith, H., Shi, X., Gonzalo, J.A., Newman, W., et al. 1996. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* 97:604-612.
336. Denton, C.P., and Abraham, D.J. 2004. Transgenic analysis of scleroderma: understanding key pathogenic events in vivo. *Autoimmunity Reviews* 3:285-293.
337. Polentarutti, N., Introna, M., Sozzani, S., Mancinelli, R., Mantovani, G., and Mantovani, A. 1997. Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes and endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* 8:271-274.
338. Wang, X., Li, X., Yue, T.L., and Ohlstein, E.H. 2000. Expression of monocyte chemotactic protein-3 mRNA in rat vascular smooth muscle cells and in carotid artery after balloon angioplasty. *Biochim Biophys Acta* 1500:41-48.
339. Menten, P., Proost, P., Struyf, S., Van Coillie, E., Put, W., Lenaerts, J.P., Conings, R., Jaspar, J.M., De Groote, D., Billiau, A., et al. 1999. Differential induction of monocyte chemotactic protein-3 in mononuclear leukocytes and fibroblasts by interferon-alpha/beta and interferon-gamma reveals MCP-3 heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* 29:678-685.
340. Thompson, W.L., and Van Eldik, L.J. 2009. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]. *Brain Research* 1287:47-57.

341. Dahinden, C.A., Geiser, T., Brunner, T., von Tscharner, V., Caput, D., Ferrara, P., Minty, A., and Baggiolini, M. 1994. Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J Exp Med* 179:751-756.
342. Stafford, S., Li, H., Forsythe, P.A., Ryan, M., Bravo, R., and Alam, R. 1997. Monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3)/fibroblast-induced cytokine (FIC) in eosinophilic inflammation of the airways and the inhibitory effects of an anti-MCP-3/FIC antibody. *J Immunol* 158:4953-4960.
343. Michalec, L., Choudhury, B.K., Postlethwait, E., Wild, J.S., Alam, R., Lett-Brown, M., and Sur, S. 2002. CCL7 and CXCL10 orchestrate oxidative stress-induced neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 168:846-852.
344. Tsou, C.-L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 117:902-909.
345. Schenk, S., Mal, N., Finan, A., Zhang, M., Kiedrowski, M., Popovic, Z., McCarthy, P.M., and Penn, M.S. 2007. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells* 25:245-251.
346. Szymczak, W.A., and Deepe, G.S. 2009. The CCL7-CCL2-CCR2 axis regulates IL-4 production in lungs and fungal immunity. *J Immunol* 183:1964-1974.
347. Ong, V.H., Evans, L.A., Shiwen, X., Fisher, I.B., Rajkumar, V., Abraham, D.J., Black, C.M., and Denton, C.P. 2003. Monocyte chemoattractant protein 3 as a mediator of fibrosis: Overexpression in systemic sclerosis and the type 1 tight-skin mouse. *Arthritis Rheum* 48:1979-1991.
348. Ong, V.H., Carulli, M.T., Xu, S., Khan, K., Lindahl, G., Abraham, D.J., and Denton, C.P. 2009. Cross-talk between MCP-3 and TGFbeta promotes fibroblast collagen biosynthesis. *Experimental Cell Research* 315:151-161.
349. Schols, D., Proost, P., Van Damme, J., and De Clercq, E. 1997. RANTES and MCP-3 inhibit the replication of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (SF-2, MN, and HE). *J Virol* 71:7300-7304.
350. Potmesil, P., Holý, A., Kmonícková, E., Krízková, J., and Zídek, Z. 2007. Acyclic nucleoside phosphonate antivirals activate gene expression of monocyte chemotactic protein 1 and 3. *J Biomed Sci* 14:59-66.
351. Fioretti, F., Fradelizi, D., Stoppacciaro, A., Ramponi, S., Ruco, L., Minty, A., Sozzani, S., Garlanda, C., Vecchi, A., and Mantovani, A. 1998. Reduced tumorigenicity and augmented leukocyte infiltration after monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) gene transfer: perivascular accumulation of dendritic cells in peritumoral tissue and neutrophil recruitment within the tumor. *J Immunol* 161:342-346.
352. Wetzel, K., Menten, P., Opdenakker, G., Van Damme, J., Grone, H.J., Giese, N., Vecchi, A., Sozzani, S., Cornelis, J.J., Rommelaere, J., et al. 2001. Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med* 3:326-337.
353. Hu, J.-Y., Li, G.-C., Wang, W.-M., Zhu, J.-G., Li, Y.-F., Zhou, G.-H., and Sun, Q.-B. 2002. Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis. *World J Gastroenterol* 8:1067-1072.
354. Edman, L.C., Mira, H., and Arenas, E. 2008. The beta-chemokines CCL2 and CCL7 are two novel differentiation factors for midbrain dopaminergic precursors and neurons. *Experimental Cell Research* 314:2123-2130.
355. Bonfield, T.L., John, N., Malur, A., Barna, B.P., Culver, D.A., Kavuru, M.S., and Thomassen, M.J. 2005. Elevated monocyte chemotactic proteins 1, 2, and 3 in

- pulmonary alveolar proteinosis are associated with chemokine receptor suppression. *Clin Immunol* 114:79-85.
356. Choi, E.S., Jakubzick, C., Carpenter, K.J., Kunkel, S.L., Evanoff, H., Martinez, F.J., Flaherty, K.R., Toews, G.B., Colby, T.V., Kazerooni, E.A., et al. 2004. Enhanced monocyte chemoattractant protein-3/CC chemokine ligand-7 in usual interstitial pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170:508-515.
 357. Park, B.L., Kim, L.H., Choi, Y.H., Cheong, H.S., Park, H.-S., Hong, S.-J., Choi, B.W., Lee, J.-H., Uh, S.-T., Park, C.-S., et al. 2005. Association analysis of monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) polymorphisms with asthmatic phenotypes. *J Biochem Mol Biol* 38:77-81.
 358. Wedemeyer, J., Lorentz, A., Göke, M., Meier, P.N., Flemming, P., Dahinden, C.A., Manns, M.P., and Bischoff, S.C. 1999. Enhanced production of monocyte chemotactic protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa. *Gut* 44:629-635.
 359. Dezerega, A., Pozo, P., Hernández, M., Oyarzún, A., Rivera, O., Dutzan, N., Gutiérrez-Fernández, A., Overall, C.M., Garrido, M., Alcota, M., et al. 2010. Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* 81:267-276.
 360. McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289:1202-1206.
 361. McQuibban, G.A., Gong, J.-H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100:1160-1167.
 362. Dean, R.A., Cox, J.H., Bellac, C.L., Doucet, A., Starr, A.E., and Overall, C.M. 2008. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112:3455-3464.
 363. Ali, S., Robertson, H., Wain, J.H., Isaacs, J.D., Malik, G., and Kirby, J.A. 2005. A non-glycosaminoglycan-binding variant of CC chemokine ligand 7 (monocyte chemoattractant protein-3) antagonizes chemokine-mediated inflammation. *J Immunol* 175:1257-1266.
 364. Ali, S., O'Boyle, G., Hepplewhite, P., Tyler, J.R., Robertson, H., and Kirby, J.A. 2010. Therapy with nonglycosaminoglycan-binding mutant CCL7: a novel strategy to limit allograft inflammation. *Am J Transplant* 10:47-58.
 365. Bascands, J.L., and Schanstra, J.P. 2005. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int* 68:925-937.
 366. Chevalier, R.L. 2006. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:157-168.
 367. Tan, X., He, W., and Liu, Y. 2009. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney International* 76:1248-1257.
 368. Mu, W., Ouyang, X., Agarwal, A., Zhang, L., Long, D.A., Cruz, P.E., Roncal, C.A., Glushakova, O.Y., Chiodo, V.A., Atkinson, M.A., et al. 2005. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 16:3651-3660.
 369. D'Amico, G., Frascaroli, G., Bianchi, G., Transidico, P., Doni, A., Vecchi, A., Sozzani, S., Allavena, P., and Mantovani, A. 2000. Uncoupling of inflammatory

- chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nature Immunology* 1:387-391.
370. Schanstra, J.P., Neau, E., Drogoz, P., Arevalo Gomez, M.A., Lopez Novoa, J.M., Calise, D., Pecher, C., Bader, M., Girolami, J.-P., and Bascands, J.-L. 2002. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest* 110:371-379.
 371. Gougat, J., Ferrari, B., Sarra, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Maruani, J., Alonso, R., Cudennec, A., Croci, T., Guagnini, F., et al. 2004. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 309:661-669.